

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
DELL'ALIMENTAZIONE E DELLA NUTRIZIONE**

XXV CICLO

**PACKAGING ALIMENTARE E
CONTAMINAZIONE DA BISFENOLO A**

Dott. Giancarlo Palumbo

Tutor:

Prof. Maria Vallettrisco

Coordinatore:

Prof. Franco Contaldo

PREMESSA

Non potrei cominciare a descrivere il lavoro di tesi senza prima tributare la mia gratitudine alle tante persone importanti della mia vita che con amicizia, spesso con affetto, mi hanno sostenuto con la loro approvazione e, non di rado, con il loro aiuto materiale, le loro competenze; nonché, in qualche caso, per aver sopportato il troppo tempo sottratto loro. Senza di esse i miei ormai più di trenta anni di operoso servizio, spesi per la maggior parte nel campo della Merceologia applicata, mi avrebbero certo fatto esitare prima di intraprendere un impegnativo, anche se stimolante, cammino di ricerca, in genere appannaggio di persone anagraficamente più giovani di chi scrive.

Desidero innanzitutto ringraziare con grandissimo affetto e stima la mia Tutor, la Professoressa Maria Vallettrisco, Responsabile del Laboratorio Chimico-Merceologico del Dipartimento di Economia Management Istituzioni dell'Università Federico II già, quando iniziai il dottorato, Sezione di Scienze Merceologiche del Dipartimento A.P.E.S.L.P.T., per i preziosi insegnamenti di scienza e di vita che mi ha benevolmente elargito, quasi quotidianamente, in questi tre anni di lavoro e per le innumerevoli giornate dedicate alla mia tesi. Nei nostri diuturni colloqui ho trovato sempre nuovi spunti di riflessione, suggerimenti illuminanti e una pressoché totale concordanza di vedute. Sono solo rammaricato di non averla incontrata molto prima: la mia carriera scientifica e perfino le mie scelte personali avrebbero tratto certo un grande beneficio dai suoi saggi consigli e dal suo sempre vivissimo, lucido, spirito critico. Inoltre, ringrazio sentitamente la Professoressa Isa De Clemente, di cui ho sempre apprezzato la vigile attenzione anche sui piccoli dettagli di tutti i giorni, per aver contribuito a creare un clima assolutamente familiare ed avermi accolto con simpatia e fiducia nel Gruppo; la collaborazione didattica, in particolare, è andata sempre nel migliore dei modi e con reciproca soddisfazione. Anche il Coordinatore, il Professor Franco Contaldo del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale ha dimostrato stima, nonché interesse per il mio lavoro e le mie competenze e così molti suoi Colleghi, che ho avuto modo di conoscere anche nella mia qualità di Rappresentante dei Dottorandi. E' poi per me un grato dovere esprimere le mie più vive considerazione e simpatia personale, oltre che riconoscenza, al Prof. Raffaele Di Fiore, Direttore Tecnico del Laboratorio Chimico-Merceologico della Camera di Commercio di Napoli, che mi

ha benevolmente accolto nei suoi efficienti ed operosissimi Laboratori mettendomi a disposizione, con grande generosità, quanto necessario per il mio lavoro; ed un ringraziamento speciale devo ad uno dei suoi collaboratori, il Dr. Jacopo Troisi, della cui padronanza nelle tecniche strumentali, mi sono avvalso a piene mani. In questi anni, nonostante i gravosi impegni di lavoro ho sempre potuto contare sulla sua amicizia e sul suo aiuto; le nostre stimolanti, proficue discussioni scientifiche su interessi a tutto campo ci hanno reciprocamente fatto venire nuove idee e...la voglia di provarle! Colgo poi l'occasione per ringraziare ed esprimere la mia simpatia anche a tutto il restante personale del Laboratorio: la Dottoressa Alessandra Izzi, il Dott. Antonello Senatore ed il Per. Chim. Daniele Coppola che, nonostante fossero sempre indaffaratissimi, hanno tollerato, senza mai farmi pesare nulla e spesso assistendomi, le mie continue richieste ed incursioni in Laboratorio; il Sig. Luigi Esposito poi per la cordialità sempre dimostratami. La Professoressa Carla Manfredi del Dipartimento di Scienze Chimiche, a cui mi lega un'amicizia trentennale, mi è stata preziosa nello studio delle proprietà acido-base del sistema bisfenolo A-H₂O; con i suoi suggerimenti sperimentali, prima, e con il fondamentale aiuto nell'elaborazione dei dati, poi. All'amico Professor Raffaele Marotta del Dipartimento di Ingegneria chimica, dei Materiali e della Produzione industriale, sempre fraternamente disponibile, devo alcuni spettri preliminari nell'UV e utili consigli in tema di prove di cessione. Anche l'Ingegnere Manager della Ditta fornitrice dello scatolame di prova, che non nomino per suo espresso desiderio, è stato cordialissimo; ho trovato le nostre conversazioni sempre interessanti ed ho apprezzato la sua visione intelligente del mondo del packaging. Dopo tanta ricca collaborazione non restano a mio carico che le responsabilità di eventuali sviste. Infine, a chi ha avuto la costanza di leggermi sin qui, chiedo, nel considerare il lavoro, di tener conto del suo carattere assolutamente propedeutico ad ulteriori sviluppi, carattere che ha assunto, in itinere, per il fermento scientifico attuale sull'argomento ; devo dire che questo percorso di studio dottorale ha forse sollevato più interrogativi di quanti ne abbia risolti, ma ha anche prospettato moltissime intriganti possibilità di indagine, specialmente in campo biomedico, che spero, quanto prima, di poter proseguire.

Napoli, aprile 2013

Dott. Chim. Giancarlo Palumbo

INDICE

Capitolo 1 Il problema della migrazione di componenti indesiderati negli alimenti

1.1	Il complesso universo del packaging.	Pag. 5
1.2	Dati economico-statistici relativi alla filiera degli imballaggi	Pag. 6
1.3	Fonti di contaminanti e meccanismi di cessione.	Pag. 8
1.4	Normativa di controllo ed azioni Governative mondiali	Pag. 15

Capitolo 2 I contaminanti alimentari ad azione interferente endocrina : il bisfenolo A (BPA) come caso studio.

2.1	Natura chimica e fonti dei principali <i>endocrine disruptors</i>	Pag. 23
2.2	Il bisfenolo A e suoi derivati:caratteristiche chimico-fisiche, volumi di produzione industriale e applicazioni.	Pag. 26
2.3	Effetti biologici del bisfenolo A	Pag. 30
2.4	Fonti di esposizione alimentari e non	Pag. 32

Capitolo 3 La determinazione analitica del BPA.

3.1	Studio preliminare delle proprietà acido-base del sistema bisfenolo A-H ₂ O	Pag. 34
3.2	Valutazione della solubilità del bisfenolo A in acqua: confronto tra gravimetria e gas cromatografia (GC-MS)	Pag. 38
3.3	Disamina dei metodi analitici in letteratura, individuazione, messa a punto e validazione di due metodiche strumentali cromatografiche.	Pag. 39

Capitolo 4 Applicazione delle metodiche di analisi a tipologia di packaging modello con l'uso dei simulanti.

4.1 Estraibilità del bisfenolo A: prove di estrazione con solventi a vari pH	Pag. 44
4.2 Studio di cessione del bisfenolo A da scatolame metallico con rivestimento interno a base di BPA	Pag. 47
4.3 Il caso dello scatolame metallico con rivestimento interno BPA free	Pag. 51

Capitolo 5 Valutazione del livello di contaminazione da BPA in alcuni alimenti tipo

5.1 Procedura e condizioni operative	Pag. 55
--------------------------------------	---------

Prospettive di approfondimento	Pag. 57
---------------------------------------	---------

Bibliografia	Pag. 58
---------------------	---------

Sitografia	Pag. 65
-------------------	---------

“If you don't have BPA in your body, you're not living in the modern world.”

Walsh B., “The Perils of Plastic”, Time. 1 April 2010

Capitolo 1

Il problema della migrazione di componenti indesiderati negli alimenti.

1.1 Il complesso universo del packaging.

I materiali destinati a venire a contatto con gli alimenti svolgono un ruolo fondamentale nella conservazione e nel consumo degli stessi dal produttore al consumatore finale. Nella gran parte dei casi, essi fungono da contenitore-rivestimento-imballaggio (**wrapping-material**) a tutela e protezione dell'alimento involucro protettivo (**packaging**).

Il DOE (Department of Environment, UK) dà la seguente definizione di packaging *"all products made of any materials of any nature to be used for the containment, protection, handling, delivery and preservation of goods from the producer to the user or consumer."* Mentre il noto Ente di normazione Americano, l'American Society for Testing and Materials (ASTM) ha fornito già da parecchi anni definizioni univoche sia di **packaging** che di **packing**, (ASTM D996-04 Standard Terminology of Packaging and Distribution Environments); il primo termine si riferisce sia ai manufatti che alle operazioni di confezionamento dei prodotti, il secondo alle operazioni e ai prodotti deputate alla movimentazione dei beni.

L'imballaggio, per la normativa legale e regolamentare italiana, è *il prodotto, composto di materiali di qualsiasi natura, adibito a contenere e a proteggere determinate merci, dalle materie prime ai prodotti finiti, a consentire la loro manipolazione e la loro consegna dal produttore al consumatore o all'utilizzatore, e ad assicurare la loro presentazione, nonché gli articoli a perdere usati allo stesso scopo* (art. 35, lett. a), ex decreto legislativo 22/97, ora art. 218 del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152 recante Norme in materia ambientale.).

Secondo la classificazione riportata nel decreto sopracitato, in Italia gli imballaggi sono distinti in tre tipologie o categorie funzionali: **imballo primario** (per la vendita), **imballo secondario** (multiplo), **imballo terziario** (per il trasporto). Quando l'imballaggio è destinato a proteggere e/o valorizzare gli alimenti si parla (con espressione forse non

felicissima ma anche questa ormai così diffusa ed inserita in atti ufficiali) appunto di packaging alimentare.

La tabella 1.1 riassume i più importanti requisiti del moderno packaging:

Tabella 1.1

Alcune delle principali funzioni di una evoluta confezione per alimenti
Contenere adeguatamente il prodotto alimentare
Proteggere l'alimento da danni meccanici
Rappresentare un'adeguata barriera a gas, vapori e liquidi
Prevenire o ritardare la degradazione biologica
Prevenire o ritardare la degradazione fisica
Facilitare la movimentazione e il magazzinaggio
Presentare il prodotto in forma attraente e svolgere funzione di <i>silent vendor</i>
Rappresentare un'opportunità di informazione per una scelta consapevole
Consentire l'identificazione sicura del prodotto
Consentire di rilevare visivamente e/o elettronicamente lo stato di freschezza dell'alimento

Modificata ed integrata da: Luciano Piergiovanni, Sara Limbo, Food packaging, Materiali, tecnologie e qualità degli alimenti, Springer Verlag, Milano, 2010

1.2 Dati economico-statistici relativi alla filiera degli imballaggi.

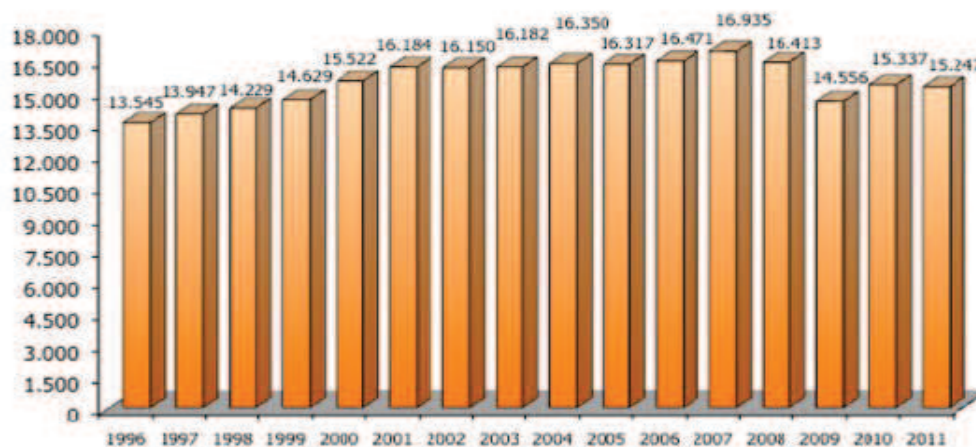
I consumi di materiali di packaging sono molto simili in tutto il mondo industrializzato e possono essere così ripartiti (valori in peso): 40% materiali cellulosici, 30% plastiche, 19% metalli e 7% vetro. La tabella seguente (Riva, DISTAM) fornisce un'idea dell'entità del mercato relativo alle principali filiere dell'imballaggio.

Tabella 1.2

Fatturato e produzione delle principali filiere dell'imballaggio nazionale		
Tipologia materiale	Fatturato (10³ €)	Produzione (10³ t)
Acciai rivestiti	1.070	684
Alluminio	1.920	171
Cellulosici	7.000	5.303
Poliaccoppiati (semirigidi)	380	132
Plastica	10.500	3.383
Vetro	1.080	3.641
Legno	1.700	3.169
Acciai rivestiti	1.070	684
Alluminio	1.920	171

Il mercato relativo al packaging, anche per il nostro Paese, ha numeri che sono di tutto rispetto nell'economia mondiale. Attualmente (marzo 2013) secondo quanto riportato sul sito ufficiale dell'Istituto Imballaggio, "il consolidato 2011 della produzione mondiale di imballaggi è valutata in 470 miliardi di euro, di cui le principali aree sono: l'Asia con uno share del 28,5% tendenzialmente in aumento, il Nord America con il 26% e l'Europa Occidentale con uno share del 27%. Nord America e Europa occidentale hanno lievemente ridotto la loro partecipazione. Seguono l'area dell'Europa dell'Est (compresa la Russia) con una partecipazione del 9,5%, il Sud Centro America con uno share complessivo del 5,2%, l'Africa con il 2,2% e l'Oceania con l'1,6%. L'Italia, con un fatturato di circa 28,6 miliardi di Euro, rappresenta il 6% della produzione mondiale, collocandosi tra i dieci paesi maggiori produttori di packaging ". Nel grafico 1.1 che segue viene rappresentato lo spaccato della produzione globale di imballaggi riferito al periodo 1996-2011.

Grafico 1.1 Andamento della produzione di imballaggi in Italia (inclusi sacchi RSU)
Valori in t/000 Fonte: elaborazioni Istituto Italiano Imballaggio



1.3 Fonti di contaminanti e meccanismi di cessione.

Potrebbe sembrare una contraddizione – ed è, in effetti, un po' paradossale- il fatto che proprio il packaging, destinato anche a proteggere l'alimento dalle contaminazioni di agenti esterni, possa divenire esso stesso sorgente di sostanze chimiche indesiderate. Naturalmente è necessario rimarcare il fatto che nessun materiale è perfettamente inerte ed insolubile; ciò è termodinamicamente impossibile e, quindi, la contaminazione chimica da materiali in contatto con alimenti è un evento sempre possibile. Ciò premesso si deve dunque accettare, come inevitabile, il fatto che tutti i materiali utilizzati nella produzione del packaging possono essere fonte potenziale di contaminazione degli alimenti posti in contatto con essi (essendo, essi materiali, spesso, di natura complessa per l'elevato numero di componenti aggiunti per migliorarne le prestazioni estetiche o funzionali. Le sostanze che possono migrare dalle materie plastiche agli alimenti possono essere classificate, a seconda dell'origine in tre categorie fondamentali.

Sostanze intenzionalmente aggiunte. Le principali sono rappresentate dagli additivi: sostanze aggiunte al materiale per modificarne le caratteristiche o promuovere una particolare funzione. Per quanto riguarda le materie plastiche, esse costituiscono una classe di sostanze veramentenumerosa ed eterogenea e spesso vi è poca affinità tra il potenziale migrante e la

matricepolimerica nella quale l'additivo è disperso. Rientrano in questa categoria assai complessa gli stabilizzanti al calore, gli stabilizzanti alla luce, i plastificanti, sfruttati per modificare le proprietà reologiche del fuso e consentire la formatura a stampo, i lubrificanti, gli agenti antiscivolo, quelli scivolanti, gli antiossidanti, le cariche, i pigmenti, gli agenti rigonfianti, gli agenti antistatici e gli additivi antifog (antiappannanti). Alcuni di questi esplicano la loro azione nella massa del polimero ed è quindi opportuno che siano uniformemente distribuiti nel mezzo. Altri, invece, sono aggiunti per agire all'interfaccia (con l'ambiente o con l'alimento) e quindi è auspicabile una loro elevata mobilità nel polimero per garantirne un'adeguata concentrazione dove più è utile la loro presenza. Gli additivi antistatici, per esempio, devono evitare l'adesione di polvere sulla superficie, mentre quelli antifog devono impedire la microcondensazione dell'acqua sulla superficie e svolgono la loro specifica funzione all'interfaccia, alimento/imballaggio o imballaggio/ambiente.

Residui di varia natura. Le sostanze impiegate nelle operazioni di polimerizzazione, di produzione o di trasformazione (monomeri, catalizzatori, solventi, adesivi ecc.) possono residuare nel materiale finito, se il processo di produzione non le allontana *completamente* (ma naturalmente la parola completamente è solo nominale: è solo questione di livello di accettabilità del residuo nel materiale) e dare luogo a fenomeni di migrazione.

Prodotti di neoformazione. Sostanze che si originano dalla decomposizione spontanea dei materiali costituenti nel tempo o in concomitanza di particolari condizioni ambientali, durante le operazioni di trasformazione in manufatto o che derivano da reazioni tra i costituenti del materiale o degli additivi. Questa categoria di potenziali migranti comprende le sostanze meno note anche perché, condizioni variabili possono far scaturire sostanze inaspettate ed in essa rientrano contaminanti più difficili da individuare e prevenire. Sono indicati con l'acronimo NIAS, ("sostanze non intenzionalmente aggiunte", Not Intentionally Added Substances).

I principali materiali da packaging

Tra tutti i materiali di imballaggio, ancor oggi in pratica usati, il vetro è quello noto dai tempi più remoti. Le prime testimonianze del suo impiego anche se non tutte e non solo relative alla fabbricazione di contenitori risalgono ad almeno 3000-3500 anni fa, quando si cominciarono a lavorare, per ricavarne oggetti utili, blocchi di vetro naturale di origine vulcanica (ossidiana); solo nel 200 d.C. però si incominciò a soffiare il vetro per produrre corpi cavi per gli impieghi più svariati. Oggi nell'ambito del packaging alimentare gli

impieghi del vetro sono legati prevalentemente alla produzione dei cosiddetti contenitori cavi (bottiglie, , bicchieri, flaconi, etc). Tuttavia nonostante l'impiego diffusissimo degli imballaggi di polimeri plastici sintetici come, ad esempio il polietilentereftalato (PET), il vetro, grazie a proprietà come quella termica, la (relativa) inerzia chimica ed un impatto organolettico virtualmente nullo, che lo rendono adatto al contenimento di produzioni alimentari come le conserve di qualità o di prodotti di bevande alcoliche come l'olio extravergine di oliva, conserva ancora, nonostante svantaggi come la fragilità e la densità elevata, un posto di rilievo nel complesso mondo del packaging alimentare.

Eppure persino il **vetro** considerato il più inerte e sicuro dei materiali per imballaggio può cedere – anche se in misura minima rispetto ad altri materiali - sostanze indesiderate; infatti la moderna tecnologia di produzione dei recipienti di vetro si è evoluta per realizzare imballaggi più leggeri (di circa la metà rispetto a 30-40 anni fa) ma dotati di maggiore resistenza meccanica. Questi trattamenti, hanno lo scopo di aumentare la resistenza alle sollecitazioni del contenitore di vetro e di ridurre il coefficiente di attrito sulla superficie; ad esempio il c.d. **Hot-end**, o trattamento a caldo, è l'operazione che consiste nello spruzzare il contenitore – all'uscita dallo stampo e prima dell'ingresso nel forno di ricottura – con una soluzione di tetracloruro di stagno (SnCl_4), tetracloruro di titanio (TiCl_4) o cloruro di dimetilstagno $[(\text{CH}_3)_2\text{SnCl}_2]$; i sali depositati sulla superficie pirolizzano a circa 550 °C e fissano sulla superficie del vetro una sottile pellicola di ossido di metallo, che “stuccando” microscalfitture e/o microincrinature irrobustisce il contenitore prevenendo, in caso di shock meccanico, la formazione e la propagazione delle microcricche che porterebbero alla rottura del contenitore. La pellicola di ossidi metallici aumenta, però, notevolmente il coefficiente di attrito; pertanto questo viene successivamente ridotto spruzzando una dispersione di cere, oleati, stearati, glicoli sulla superficie dei contenitori all'uscita della zona fredda. Questi trattamenti non alterano l'aspetto naturale del vetro ma gli alimenti in contatto possono essere contaminati da stagno e/o composti organici antiattrito. Nel campo degli imballaggi flessibili, anche gli **imballaggi alimentari a base cellulosica**, sono ben più evoluti dei primi contenitori di cartoncino paraffinato e rientrano nel campo dei materiali compositi. Sempre più frequentemente materiali diversi sono utilizzati insieme per produrre imballaggi per alimenti: fogli di carta sono accoppiati con film plastici, strati di cartoncino vengono rivestiti di plastica e/o uniti a fogli sottili di alluminio e plastiche diverse possono essere combinate mediante coestrusione e coiniezione. Le tecnologie proprie della filiera dell'imballaggio flessibile sono molto versatili e applicabili a un grande numero di materiali differenti allo scopo di coniugare le migliori proprietà fisiche e chimiche dei vari materiali in

un unico foglio: la scarsa permeabilità a liquidi e gas dei film plastici, il potere termoriflettente dell'alluminio, la ricettività alla stampa poligrafica dei materiali cartacei, etc. Naturalmente, anche in questo caso nascono problematiche di cessione di sostanze di varia natura all'alimento.

Labanda stagnata, costituita da una lamina di acciaio al carbonio protetta dall'ossidazione con vari materiali, è il più antico dei materiali metallici impiegati per il condizionamento alimentare, anche se la sua struttura attuale è assai differente da quella delle prime bande stagnate, prodotte sin dalla fine del Seicento. I rivestimenti sono prevalentemente a base di ossidi di stagno, ossidi di cromo e, quel che più è rilevante nel senso del lavoro della presente tesi, *vernici polimeriche*. Il rivestimento non supera mai lo 0,5% dello spessore totale, ma può incidere sul costo finale anche per oltre il 10% e rappresenta la principale fonte di contaminanti per gli alimenti a contatto.

Questo importantissimo materiale, il cui fatturato nel 2007 era, secondo dati del 2008 dell'Istituto Italiano Imballaggio, di oltre un miliardo di euro con un'esportazione di 218000 tonnellate; l'impiego del totale prodotto (v. Grafico 1.3) riguardava, nel 2007, per le scatole food, ben il 44,6%. È il materiale da packaging alimentare su cui è caduta in particolar modo l'attenzione del presente lavoro di tesi, oltre che per la larghissima diffusione – come attestato dalle statistiche riportate – anche perché il rivestimento interno è la forse la fonte più significativa di BPA negli alimenti inscatolati.

Grafico 1.3 Ripartizione percentuale relativa agli impieghi degli acciai rivestiti nel settore del packaging (dati dell'Istituto Italiano Imballaggio, 2008)

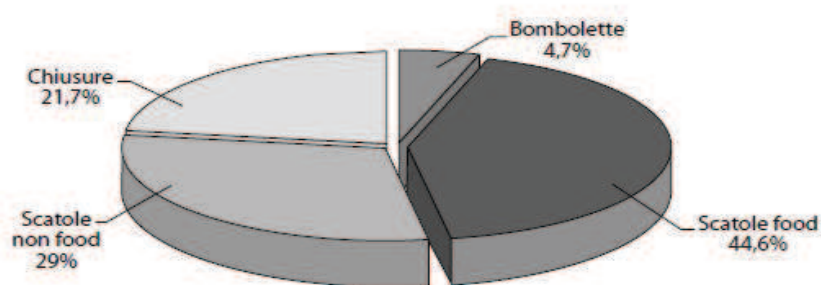
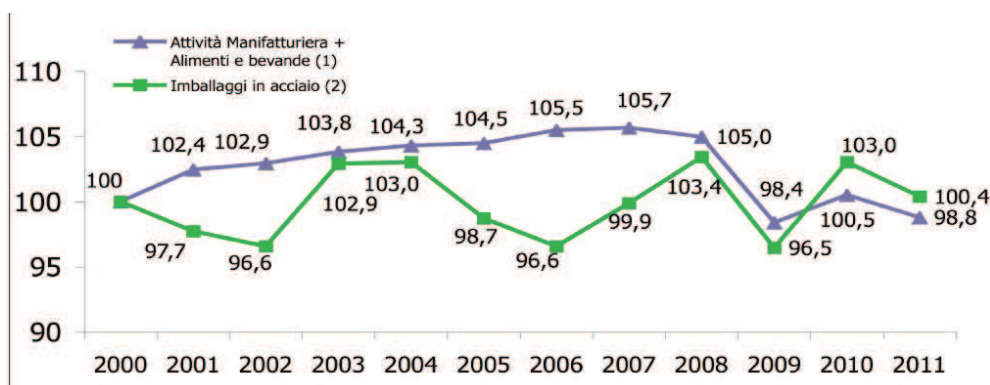


Grafico 1.4 Imballaggi in acciaio: andamento della serie storica indicizzata
Valori riferiti a n° indice 2000=100 Fonti: (1) elaborazioni Istituto Italiano
 Imballaggio sudati ISTAT(2) elaborazioni Istituto Italiano Imballaggio 2012



Il trend dell'indice produttivo degli imballaggi in acciaio è strettamente condizionato dall'andamento del settore dei derivati del pomodoro, che ha forti connotati di stagionalità e che incide mediamente per oltre il 30% sull'utilizzo di imballaggi in acciaio. Nel 2011 a fronte di una flessione dell'1,7% dell'indice dell'attività manifatturiera + alimenti e bevande, il settore imballaggi in acciaio ha segnato una flessione del 2,6%.

Tuttavia, di gran lunga più rilevanti dal punto di vista del potenziale di contaminazione alimentare sono i **polimeri organici di sintesi** sia *en mass* che quando impiegati a scopo di rivestimento per evitare il contatto con gli alimenti del supporto, magari proprio quello metallico: alluminio, banda stagnata etc; ciò sia per evitare fenomeni di corrosione che, *per colmo d'ironia*, per limitare la cessione di sostanze indesiderate (metalli) al cibo.

Detti materiali di sintesi sono per lo più derivati da processi industriali della lavorazione di prodotti del petrolio e sono definiti materiali e oggetti di **materia plastica**. La materia plastica è un materiale con straordinarie proprietà chimiche e fisiche: non è facilmente deteriorabile, è resistente all'attacco di agenti esterni (batteri, raggi UV, ossigeno, variazioni climatiche, etc); specie se opportunamente additivata, ha una maggiore resistenza il che si riflette, naturalmente, sulla sua biodegradabilità. Vi sono però altre m.p., che hanno minore resistenza come ad esempio la posateria da cucina; che fa parte della categoria dei cosiddetti manufatti "usa e getta" e, quindi, per questa tipologia ci si attende, un maggior potenziale contaminante. Le diverse tipologie di m.p. che possono venire a contatto con gli alimenti sono caratterizzate da un

marchio informativo corrispondente ad un codice internazionale di riciclo (il cui significato spesso, ahimè, è totalmente ignoto all'utente finale). Il codice è variabile da una scala numerica progressiva che va da 01 a 07 e indica il composto di cui è formata la m.p. e la sua modalità di riciclaggio.

Ci sono dunque sette classi di plastiche utilizzate per gli imballaggi. La classe 7 è un po' la classe polivalente ed alcune di queste plastiche, come il policarbonato, spesso identificato con la sigla PC, e le resine epossidiche sono prodotte a partire dal monomero Bisfenolo A.

Il tipo 3 (PVC, polivinilcloruro) pur non essendo una m.p. a base di policarbonato o resine epossifenoliche, può contenere il Bisfenolo A come antiossidante nei plastificanti (Fiege, Helmut, 2002)

Gli elementi coinvolti nel fenomeno della contaminazione alimentare da packaging sono: il materiale, il mezzo di contatto (alimento) e la sostanza/e migranti; mentre i fattori che principalmente possono condizionare l'entità della migrazione sono: il tempo, la temperatura, le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche e la superficie effettiva di contatto. Il fenomeno di trasferimento dall'imballaggio all'alimento avviene con modalità diverse – in funzione delle proprietà del migrante, della matrice che lo contiene e della fase a contatto – che sono state classificate in vario modo. Facendo riferimento in particolare ad alcune caratteristiche del migrante, si possono, secondo Piergiovanni e Limbo, in modo schematico, descrivere tre modi di migrazione.

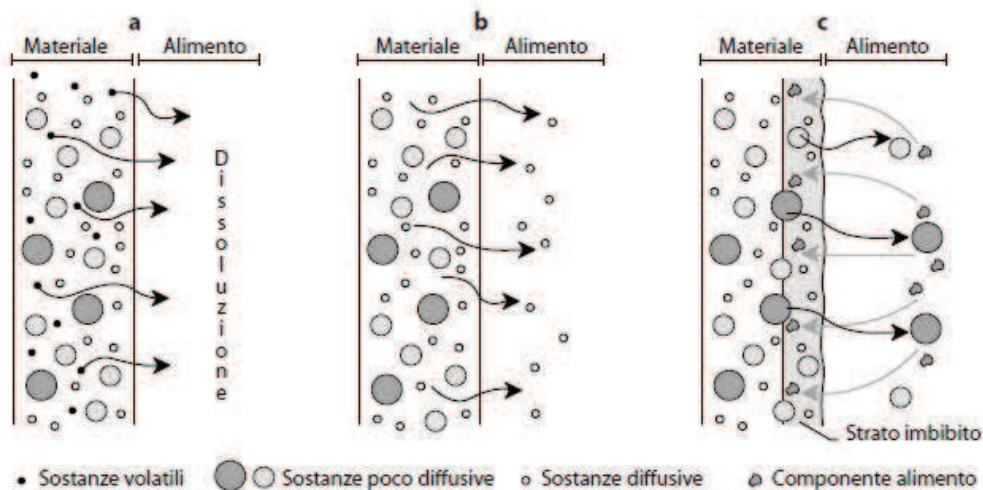
Migrazione spontanea. Riguarda il trasferimento di migranti volatili ed è il tipico meccanismo dell'assunzione di odori estranei (di plastica, di cartone, di chimico ecc.) da parte dell'alimento confezionato, ma anche della migrazione di alcuni importanti monomeri gassosi cloruro di vinile ed etilene, di cui il primo ha una dimostrata cancerogenicità. Il fenomeno della migrazione può interessare entrambe le facce dell'imballaggio (verso l'alimento e verso l'ambiente) e non richiede un contatto tra materiale e alimento per la possibilità del migrante di trasferirsi in fase gassosa. L'entità della contaminazione alimentare è determinata dalla temperatura, dalla velocità di diffusione nel mezzo e dalla solubilità del migrante nell'alimento oltre che dalla sua persistenza.

Migrazione per contatto di sostanze diffusive. In questo caso si considerano migranti solubili nell'alimento ma non volatili. Affinché la sostanza si trasferisca nell'alimento sarà sempre necessario un contatto tra le due fasi, ma il fenomeno procede abbastanza velocemente perché i migranti considerati hanno elevati coefficienti di diffusione e si possono considerare

sempre presenti all'interfaccia. È il tipico meccanismo di migrazione degli additivi antistatici e antifog, quando tali additivi sono aggiunti in massa nel polimero.

Migrazione per contatto di sostanze poco diffusive. Nel caso di sostanze poco diffusive, affinché si verifichi contaminazione essa dovrà essere preceduta da una migrazione negativa: un componente dell'alimento migra nell'imballaggio (frequentemente la componente grassa) e nello strato del materiale modificato, spesso rigonfiato dall'assorbimento, la diffusività aumenta consentendo il trasferimento di massa. Nello schema seguente (figura 1.1), tratto da Piergiovanni e Limbo, Food packaging, 2010, si schematizzano i meccanismi di migrazione elencati:

Figura 1.1



dove: **a:** migrazione spontanea di sostanze volatili; **b:** migrazione per contatto di sostanze poco diffusive; **c:** migrazione per contatto di sostanze poco diffusive, dopo imbibizione del materiale.

A seconda poi del meccanismo chimico-fisico prevalente possiamo avere diversi modalità di “trasferimento” di componenti dal materiale all'alimento (avviene anche il fenomeno inverso ma questo, di norma, non rappresenta un problema)

- 1) Migration (diffusione-ripartizione) tipico di: *materie plastiche, gomme.*
- 2) Leaching (corrosione ossidoriduttiva, scambio ionico, etc) tipico di: *materiali metallici, vetrosi, ceramici*

3) Release(adsorbimento/desorbimento) tipico di: *materiali cellulosici*

1.4 Normativa di controllo ed azioni Governative mondiali

Diversi provvedimenti nazionali e comunitari disciplinano in maniera sempre più restrittiva ed attenta i materiali destinati a venire a contatto con gli alimenti, nell'ottica di una sicurezza che il consumatore, sempre più consapevole, reclama.

La Commissione Europea ha, negli ultimi tempi, fatto ricorso più a Regolamenti che a Direttive in modo da accelerarne l'applicabilità in tutto il territorio dell'UE; il risultato è la sequenza di norme, note e circolari ministeriali tese a diffonderne e puntualizzarne, nei casi specifici, i contenuti. Per il Regolamento 10/2011, denominato "Regolamento PIM" (acronimo di Plastics Implementation Measure), uniforma la materia in un unico corpus normativo. Il suddetto regolamento, entrato in vigore dal 1 ° maggio 2011, non deve essere recepito dalla legislazione nazionale ma si applica direttamente agli Stati Membri; ad esempio, per le materie plastiche a contatto con alimenti, in totale, nell'arco di circa 7 anni, la direttiva - relativamente a monomeri ed additivi - è stata modificata in maniera sostanziale ben sei volte, e quella relativa alle prove di migrazione due volte.

Alla promulgazione del Reg. Quadro(CE)n.1935/2004, che stabilisce i requisiti generali cui devono rispondere tutti i materiali ed oggetti a contatto con gli alimenti (MOCA), ha fatto dunque seguito, prima il Reg.(CE) n.2023 /2006 che indica le norme sulle buone pratiche di fabbricazione, identificabili nella sigla inglese **GMP** (*Good Manufacturing Practice*) e, poi, il Reg.(CE) n.450/2009 che concerne i materiali *attivi* e *intelligenti*, (**active, intelligent packaging**) sostanze da incorporare nei materiali destinati al confezionamento alimentare di cui riportiamo (M.Riva, DISTAM) due stringenti definizioni:

Active Packaging: *Sistemi in cui un materiale di confezionamento e l'ambiente interagiscono positivamente estendendo la shelf life (o durabilità) dell'alimento, oppure consentono di raggiungere alcune prestazioni che non possono essere ottenute altro modo, o ancora migliorano la sicurezza ed esaltano alcune proprietà sensoriali, nel rispetto della qualità complessiva dell'alimento.*

Intelligent Packaging: *Una serie di ritrovati tecnologici che migliorano la funzione di comunicazione dell'imballaggio onde facilitare decisioni ed azioni che apportano un beneficio desiderato (soprattutto nell'ambito del monitoraggio delle condizioni di conservazione e distribuzione) e nel merito della piena espressione della qualità e della sicurezza dell'alimento. Il termine viene spesso declinato riduttivamente come*

“Smart Packaging” o “Responsible Packaging”, e concepito come un semplice sistema che fornisce informazioni sulla ritenzione delle caratteristiche qualitative durante la conservazione e il trasporto.

Quest’ ultimo regolamento ha permesso che tutti quei dispositivi, introdotti a partire dagli anni novanta dalle aziende alimentari, per mantenere o migliorare la *shelf-life* dei propri prodotti, potessero essere tranquillamente impiegati. Accanto dunque ai materiali *attivi*, concepiti in modo da incorporare deliberatamente componenti, che rilasciano sostanze nell’alimento imballato o nel suo ambiente, o le assorbono dagli stessi, ci sono quelli *intelligenti* la cui funzione è di fornire, prima al distributore e poi al consumatore, informazioni sulle condizioni di conservazione, senza però rilasciare i loro elementi costitutivi.

Posizionati in genere sulla superficie esterna dell’imballaggio, possono anche essere separati soltanto da una *barriera funzionale* che rallenti cioè la migrazione di sostanze verso l’alimento, senza bloccarle totalmente; non si tratta, dunque, di una barriera assoluta ma funzionale che serve solo a rallentare la migrazione delle sostanze verso l’alimento.

Dunque, ciò che da sempre ha preoccupato il legislatore europeo è stato il **materiale plastico** nelle sue varie forme, **sia allo stato vergine che riciclato**, allorché, col Reg.n.1895/2005 ha ristretto l’uso di alcuni derivati epossidici in materiali e oggetti destinati a venire a contatto con prodotti alimentari, e, col Reg.n.282/2008, si è occupato di plastica riciclata, definendone i requisiti che non possono prescindere da un processo di riciclo, autorizzato e gestito da un sistema appropriato di assicurazione della qualità.

Il testing

Un imballaggio alimentare deve soddisfare a numerose e diverse funzioni; non è quindi facile definire univocamente cosa deve intendersi come sua *idoneità* al contenimento di alimenti. Un’opportuna distinzione deve essere sicuramente operata tra il concetto di idoneità funzionale e quello di idoneità alimentare. Quella che interessa nel contesto del presente studio è l’idoneità alimentare, che riguarda fundamentalmente la sicurezza del materiale destinato a entrare in contatto con gli alimenti, che non devono subire modificazioni o contaminazioni, siano queste di natura chimica, microbiologica o sensoriale.

Una preventiva garanzia in questo senso può essere fornita solo dal produttore dell’imballaggio e dal fornitore delle materie prime necessarie per la sua

preparazione (Dichiarazione di conformità, rintracciabilità dei MOCA (MCA o MOCA materiali a contatto con alimenti o nella letteratura anglosassone, FCM, (Food Contact Materials) secondo l'art. 17 Reg. CE n. 1935/2004). I requisiti generali dei FCM sono stabiliti all'art. 3 del Regolamento, di seguito riportato.

1. I materiali e gli oggetti, compresi i materiali e gli oggetti attivi e intelligenti, devono essere prodotti conformemente alle buone pratiche di fabbricazione (GMP) affinché, in condizioni d'impiego normali o prevedibili, essi non trasferiscano ai prodotti alimentari componenti in quantità tale da:

- a) costituire un pericolo per la salute umana;*
- b) comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari;*
- c) comportare un deterioramento delle loro caratteristiche organolettiche.*

2. L'etichettatura, la pubblicità e la presentazione di un materiale o di un oggetto non deve fuorviare i consumatori.

Pur considerando ogni possibile forma di interazione tra gli alimenti e i materiali a contatto, la materia dell'idoneità alimentare è strettamente legata ai fenomeni di migrazione che viene valutata in due forme: migrazione globale e migrazione specifica.

Migrazione globale

Il limite di migrazione globale va inteso come un prerequisito di inerzia del materiale; in altre parole, a prescindere dall'eventuale rischio per il consumatore, la legge stabilisce in tutta la UE che gli oggetti di materie plastiche sono assoggettati a un limite di migrazione globale (MG, migrazione globale; **OML, Overall Migration Limit**) pari a 10 mg dm^{-2} (massa ceduta nelle prove di determinazione della migrazione globale per unità di superficie del materiale di imballaggio) oppure a 60 mg kg^{-1} (o ppm, come massa di materia ceduta dall'imballaggio per unità di massa dell'alimento o del suo simulante). La modalità di espressione del limite in ppm viene applicata nel caso di oggetti cavi riempibili e con capacità compresa tra 500 mL e 10 L, oppure oggetti riempibili di cui non sia possibile determinare con precisione la superficie di contatto, le guarnizioni, coperchi, tappi o altri dispositivi di chiusura; per questi oggetti, le prove di migrazione devono essere effettuate con i relativi contenitori e il calcolo del limite di migrazione riferito alle rispettive capacità. Tutti gli altri materiali, sono invece regolamentati solo a livello nazionale, e, per questi, il limite di migrazione globale, verificato con gli stessi metodi di laboratorio, vale invece 8 mg dm^{-2} e 50 mg kg^{-1} .

Tra le due modalità di espressione del limite di migrazione (mg dm^{-2} oppure mg kg^{-1}) riferendosi ad un contenitore ideale – di forma cubica e con il lato di 1 dm – che ceda da ciascuna delle sue sei facce un quantitativo massimo di 10 mg all'alimento o al simulante

alimentare che contiene, ovviamente a 1 dm^3 , cioè 1 litro, che per una densità pari convenzionalmente a 1 corrisponde a 1 kg sarà sempre possibile trasformare in mg kg^{-1} un valore determinato in mg dm^{-2} semplicemente moltiplicando per 6 il valore ottenuto.

Migrazione specifica

I limiti di migrazione specifica (MS, migrazione specifica; **SML**, *specific migration limit*) sono invece fissati tutte le volte che una particolare sostanza, potenzialmente migrabile da un imballaggio, presenti un rischio per la salute del consumatore o anche soltanto per la tutela dei caratteri organolettici del prodotto; sono espressi generalmente in mg kg^{-1} , ma possono anche essere convertiti in mg dm^{-2} quando si riferiscono a oggetti con capacità superiore a 10 L o inferiore a 500 mL o a oggetti non riempibili. I limiti dipendono dalla tossicità della sostanza e possono arrivare, per le sostanze considerate particolarmente pericolose, allo zero analitico, vale a dire al limite di sensibilità del metodo analitico scelto. La determinazione dei migranti specifici è condotta con i medesimi simulanti alimentari adottati per le prove di migrazione globale e dopo identiche condizioni di contatto con il campione in esame. La conversione tra le due modalità di espressione della migrazione ($\text{mg dm}^{-2} \times 6 = \text{mg kg}^{-1}$) consente di comparare situazioni che prevedono l'impiego di oggetti non riempibili (massa per superficie) e di trovare un riscontro con dati di tossicità o pericolosità che sono generalmente espressi in forma di "dose", tossicologicamente più fruibile, cioè di massa di migrante per massa di alimento assunto. Talvolta, come osservano Piergiovanni e Limbo l.c., questa corrispondenza si rivela inadeguata e porta a risultati paradossali. Infatti, riflettono gli Autori citati, ipotizzando la minidose di 20 g di un prodotto (per esempio un'essenza aromatica), confezionata in una bustina di un materiale con superficie di contatto pari a 44 cm^2 e che contiene un migrante con SML pari a 30 mg kg^{-1} , è lecito convertire il limite da 30 mg kg^{-1} a 5 mg dm^{-2} , essendo il volume inferiore a 500 mL. Tuttavia, analizzando attentamente la situazione, emerge che i 5 mg autorizzati a migrare da 1 dm^2 corrispondono a 2,2 mg dalla superficie a contatto con 20 g di prodotto, la cui concentrazione in migrante può corrispondere a 110 mg kg^{-1} ($1000 \text{ g kg}^{-1} \times 2,2 \text{ mg}/20 \text{ g}$), quindi tre volte il limite stabilito. All'opposto abbiamo il caso di un imballaggio, che può contenere però 20 kg con una superficie complessiva solo circa 100 volte maggiore (4420 cm^2); anche in questo caso è applicabile la modalità di espressione del limite in mg dm^{-2} per un volume superiore ai 10 L. La conseguenza è che 5 mg autorizzati a migrare da 1 dm^2 corrispondono a 221 mg dall'effettiva superficie a contatto con 20 kg di prodotto, la cui concentrazione in migrante

può corrispondere a $11,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ($1000 \text{ g kg}^{-1} \times 221 \text{ mg}/20\,000 \text{ g}$), un terzo del limite stabilito.

Modalità di determinazione dei limiti OML e SML

Il testing di conformità relativo ai materiali da imballaggio e, più in generale ai cosiddetti FCM (Food Contact Materials) o, in italiano MOCA (Materiali Oggetti a Contatto con Alimenti) prevede tipicamente come è noto, tra l'altro, l'azione di fluidi dotati di differenti caratteristiche chimico-fisiche (pH, forza ionica, momento dipolare, etc) meglio conosciuti come simulanti e che dovrebbero consentire di riprodurre in qualche modo l'azione estrattiva degli alimenti a contatto. Il nuovo regolamento PIM 10/2011 introduce nuovi metodi di prova e nuovi simulanti: per questi ultimi una particolarità è rappresentata dal simulante E ("Tenax") per la valutazione della migrazione specifica negli alimenti secchi e l'altra dalle nuove condizioni operative per la migrazione specifica e quella globale. Per verificare che i limiti di migrazione non vengano superati, si conducono prove di laboratorio con gli imballaggi interi in questione o con provini del loro materiale utilizzando di norma i simulanti: soluzioni di varie caratteristiche di acidità, polarità, etc. che riproducono la capacità estrattiva potenziale degli alimenti. Nella tabella 1.3 sono riportati in tabella sinottica le nuove tipologie di simulanti, con le loro denominazioni, di confronto con le vecchie.

Tabella 1.3

Sigla simulante	"Vecchio" simulante	"Nuovo" simulante
A	Acqua distillata	Etanolo 10% (v/v)
B	Acido acetico 3% (p/v)	Acido acetico 3% (p/v)
C	Etanolo 10% (v/v)	Etanolo 20% (v/v)
D1	Etanolo 50% (v/v)	Etanolo 50% (v/v)
D2	Olio di oliva rettificato	Olio vegetale*
E	Non esisteva, è un solido	Poli (ossido di 2,6-difenil-p-fenilene), dimensioni delle particelle 60-80 mesh, ..., 200 nm

(*) Qualunque olio vegetale con una opportuna e codificata distribuzione di acidi grassi.

Il Regolamento PIM, oltre a qualche semplificazione (un generico olio vegetale in luogo di quello di oliva rettificato, anche se con la definizione del profilo di composizione in acidi grassi) vediamo anche che l'acqua distillata, quale simulante A, viene sostituita (nella valutazione della migrazione specifica) da etanolo al 10%, il che potrebbe portare, nel caso del suo impiego, ad una sovraestrazione di taluni componenti organici. Ad esempio, in base alle indicazioni del punto 2 dell'allegato III la verifica della conformità di un recipiente in materiale plastico destinato a contenere una bevanda – poniamo – al 21% di alcool

dovrebbe, secondo questa prescrizione, essere trattato con un simulante (D1) dal contenuto di etanolo più che doppio di quello delle previste condizioni d'uso, così come un materiale destinato ad alimenti con pH di 4,6 non verrebbe controllato con il simulante B a base di acido acetico acquoso. Nel complesso si osserva una maggiore drasticità dei metodi di prova, il che potrebbe comportare la sovrastima della contaminazione degli alimenti, rispetto alle situazioni reali, ed una ingiustificata non conformità. In tali casi andrebbe, infatti, sfruttata la possibilità dell'approccio di screening ed eseguito il riscontro sull'alimento, per verificare il livello effettivo di concentrazione della sostanza migrata onde evitare la penalizzazione di un materiale da imballaggio sostanzialmente valido. I simulanti da usarsi sono scelti in base all'uso cui è destinato il materiale o, se possibile, da un elenco più dettagliato (riportato nello allegato al regolamento PIM, tabella 2), che elenca i principali alimenti e, in alcuni casi, prevede dei coefficienti di riduzione per compensare il maggiore potere estraente del simulante D (DRF, D reduction factors) rispetto agli alimenti reali. Quando nella colonna del simulante D è presente una linea di frazione e un numero (per esempio, X/5), il risultato delle prove di migrazione deve essere diviso per quel numero prima di verificare la conformità del materiale. La citata tabella contiene le seguenti informazioni:

Colonna 1 (Numero di riferimento): contiene il numero di riferimento della categoria alimentare.

Colonna 2 (Descrizione del prodotto alimentare): contiene una descrizione dei prodotti alimentari compresi nella categoria alimentare.

Colonna 3 (Simulante alimentare): contiene sotto-colonne per ciascuno dei simulanti alimentari prescritti. Il simulante alimentare nella cui sotto-colonna compare una croce è utilizzato per le prove di migrazione di materiali e oggetti non ancora venuti a contatto con prodotti alimentari.

Quando per una categoria alimentare la croce nella sotto-colonna D2 è seguita da una barra obliqua e da un numero, il risultato della prova di migrazione va diviso per tale numero prima di procedere al confronto tra il risultato e il limite di migrazione. Il numero corrisponde al coefficiente di correzione di cui al punto 4.2 dell'allegato V del citato regolamento.

Tabella 1.4Stralcio dalla tabella 2 dell’Allegato III del Regolamento CE 10/2011

Colonna 1	Colonna 2	Colonna 3					
Numero di riferimento	Descrizione dell'alimento	Simulanti					
		A	B	C	D1	D2	E
08.05.00	Mostarda (eccetto mostarda in polvere v. 08.17)	X	X(*)			X/3 (**)	

Condizioni di contatto

Gli oggetti, o i provini del materiale, vengono posti a contatto del simulante per i tempi e alle temperature standardizzate, che estremizzano le condizioni d’uso reali,correlando la “Durata del contatto nelle peggiori condizioni d’uso prevedibili” con corrispondente durata della prova gabbellata (tabelle 1.5 e 1.6). Nel caso generale di materiali e oggetti destinati a venire a contatto con prodotti alimentari di qualsiasi tipo, le prove sono effettuate impiegando i

simulanti B, C e D, ritenuti i più rigorosi, e utilizzando in ogni prova un nuovo campione o provino.

Tabella 1.5

Temperatura di contatto	
Contatto nelle peggiori condizioni d’uso prevedibili	Condizioni di prova
Temperatura di contatto	Temperatura della prova
$T \leq 5\text{ °C}$	5 °C
$5\text{ °C} < T \leq 20\text{ °C}$	20 °C
$20\text{ °C} < T \leq 40\text{ °C}$	40 °C
$40\text{ °C} < T \leq 70\text{ °C}$	70 °C
$70\text{ °C} < T \leq 100\text{ °C}$	100 °C o temperatura di riflusso
$100\text{ °C} < T \leq 121\text{ °C}$	121 °C (*)
$121\text{ °C} < T \leq 130\text{ °C}$	130 °C (*)
$130\text{ °C} < T \leq 150\text{ °C}$	150 °C (*)
$150\text{ °C} < T < 175\text{ °C}$	175 °C (*)
$T > 175\text{ °C}$	Regolare la temperatura alla temperatura effettiva dell’interfaccia con il prodotto alimentare (*)
(*)Questa temperatura va utilizzata solo per i simulanti D2 e E. Per applicazioni riscaldate sotto pressione può essere effettuata una prova di migrazione sotto pressione alla temperatura adeguata. Per i simulanti A, B, C o D1 la prova può essere sostituita da una prova a 100 °C o ad una temperatura di riflusso per una durata corrispondente a quattro volte la durata selezionata secondo le condizioni indicate nella tabella 1.	

Tabella 1.6

Durata del contatto	
Durata del contatto nelle peggiori condizioni d'uso prevedibili	Durata della prova
$t \leq 5 \text{ min}$	5 min
$5 \text{ min} < t \leq 0,5 \text{ ore}$	0,5 ore
$0,5 \text{ ore} < t \leq 1 \text{ ora}$	1 ora
$1 \text{ ora} < t \leq 2 \text{ ore}$	2 ore
$2 \text{ ore} < t \leq 6 \text{ ore}$	6 ore
$6 \text{ ore} < t \leq 24 \text{ ore}$	24 ore
$1 \text{ giorno} < t \leq 3 \text{ giorni}$	3 giorni
$3 \text{ giorni} < t \leq 30 \text{ giorni}$	10 giorni
Oltre 30 giorni	Vedere condizioni specifiche

Provvedimenti normativi di Enti Governativi

La situazione normativa mondiale è in continua evoluzione e segue gli sviluppi quasi parossistici delle sempre più frequenti pubblicazioni scientifiche; i vari Governi hanno recepito gli orientamenti più recenti applicando in maniera più o meno rigorosa il principio di precauzione; ad esempio l'Organizzazione Mondiale della Sanità, a causa dei sospettisui possibili effetti negativi dell'esposizione a basse dosi di BPA, in particolare sul sistema nervoso e sul comportamento(forti nel caso di esposizione dei bambini molto piccoli) ha annunciato, nel novembre 2009, che avrebbe organizzato una consultazione di esperti per valutare la sicurezza delBPA..

Comunque il gruppo di esperti dell'OMS raccomanda di non produrre nuovi regolamenti che limitino o vietino l'uso del bisfenolo-A, indicando che "l'avvio di misure di sanità pubblica sarebbe prematuro".

In generale la maggior parte dei Governi ha bandito l'uso di biberon in polycarbonato e/o materiali contenenti BPA. Particolarmente sensibile al tema si è rivelato il Canada dove ha creato molto allarme uno studio condotto dal Canadian Health Measures Survey (CHMS) tra il 2007 e il 2009 C in cui si è riscontrata la significativa presenza (concentrazione media geometrica di soggetti dell'età da 6 a 79 anni, pari a 1.16 microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$). di BPA nell'urina del 93% dei Canadesi ; valore coerente con gli studi internazionali che riportano una concentrazione media o mediana da 1 a 3 $\mu\text{g/L}$.

Unione Europea

Dopo che è stato pubblicato lo studio di Lang,(2008) l'EFSA ha pubblicato una dichiarazione conclusiva che lo studio ha fornito alcun motivo per rivedere l'attuale dose giornaliera tollerabile (TDI) per il BPA di 0,05 mg / kg di peso corporeo. Nel settembre 2010, l'Ufficio europeo per la sicurezza alimentare (EFSA) ha pubblicato il suo ultimo parere scientifico, sulla base di una "Valutazione globale di dati di tossicità recenti [...] ha concluso che è non stato possibile identificare nessun nuovo studio che avrebbe richiesto una revisione della attuale TDI “.

Oltre a rivedere tutti i dati e gli studi scientifici disponibili sull'esposizione attraverso la dieta, pubblicati dopo l'emanazione del parere EFSA del 2006, il gruppo di esperti scientifici sta ulteriormente valutando le incertezze circa la possibile rilevanza per la salute umana di alcuni effetti associati al BPA a bassi dosaggi, osservati nei roditori (EFSA-Q-2012-00423, l.c.).

Sulla *sezione news* (26 marzo 2013) del sito istituzionale dell'EFSA si trova, infine, la seguente dichiarazione:

“Nel perseguire il proprio impegno all'apertura e alla trasparenza, a luglio l'EFSA indirà una pubblica consultazione sul proprio parere, ancora in versione provvisoria, vertente sui possibili rischi per la salute pubblica derivanti dal bisfenolo A (BPA), una sostanza usata nei materiali a contatto con gli alimenti. Grazie alla proroga dei termini per l'adozione del parere scientifico conclusivo a novembre 2013, gli esperti scientifici dell'EFSA saranno anche in grado di analizzare i risultati dei lavori scientifici in atto sul BPA a livello europeo e di singolo Paese, portando a termine al contempo una esaustiva valutazione del rischio.”

Capitolo 2

I contaminanti alimentari ad azione interferente endocrina : il bisfenolo A (BPA) come caso studio

2.1 Natura chimica e fonti dei principali *endocrine disruptors*

Negli ultimi decenni l'opinione pubblica, i media e gli studiosi hanno dibattuto a lungo sulla possibilità che alcune di queste molecole interferiscano con il funzionamento del sistema

ormonale dell'uomo e degli animali. Tali sostanze vengono indicate con il termine di "distruttori o interferenti endocrini" (IE) o, nella letteratura anglosassone, *endocrine disruptors*. Secondo la definizione adottata dalla Unione europea "un Interferente Endocrino è una sostanza esogena, o una miscela, che altera la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie o di una (sotto)popolazione" (European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge, UK, 2-4/12/1996, *via* European Commission, The Endocrine Disruptor Website). Gli interferenti endocrini, quindi, possono compromettere la normale attività del sistema ormonale dell'uomo e degli animali che è importante per funzioni necessarie alla sopravvivenza dell'individuo (metabolismo, immunità, comportamento, sviluppo e crescita) e della specie (riproduzione).

Un numero sempre crescente di prodotti chimici è stato incluso in questo gruppo che comprende, fra gli altri, diversi pesticidi, i policlorobifenili (PCB), le diossine, i metalli pesanti, certi solventi e plastificanti industriali (specialmente gli ftalati) e il bisfenolo A.. Non tutti gli IE sono sostanze sintetizzate dall'uomo, esistono infatti in natura sostanze prodotte naturalmente da alcune specie botaniche e taluni miceti che hanno un'azione IE.

Gli interferenti endocrini naturali

Un certo numero di cereali ed altre colture sono suscettibili all'attacco fungino, sia in campo che durante la conservazione. I funghi coinvolti possono sintetizzare tossine pericolose per la salute umana, fra queste, lo **zearalenone** è considerato un interferente endocrino e viene prodotto da miceti microscopici del genere *Fusarium*. La via di esposizione dell'uomo è alimentare. Infatti, lo zearalenone viene riscontrato come sostanza indesiderata nel mais, nell'orzo, nel grano, nel sorgo, nel miglio e nel riso. È stato trovato, inoltre, nel pane, nella birra ed in campioni di acqua di superficie e sotterranea. Pertanto si deve ritenere che la principale causa di assunzione umana della **micotossina** siano i cereali ed i prodotti derivati.

Diversamente dalle micotossine, i **fitoestrogeni** non vengono prodotti dai miceti ma da alcune piante edibili. Nel corso degli anni, sono state identificate molte molecole ascrivibili a tale famiglia, raggruppate in 2 distinte classi ovvero i flavonoidi ed i non-flavonoidi. La maggior parte dei fitoestrogeni è costituita dai flavonoidi, molecole che possono costituire oltre il 7% del peso secco di alcune piante. L'azione di interferente endocrino dei fitoestrogeni è dovuta alla loro somiglianza molecolare con l'estradiolo, un ormone prodotto dall'organismo dell'uomo. La via d'esposizione è alimentare e le principali fonti di assunzione sono la soia, i legumi (lenticchie, ceci), i germogli di erba medica e di trifoglio, i semi di lino, i cereali, alcune birre,

la frutta e gli ortaggi (asparagi, carote, piselli, patate, ecc). Gli effetti dei fitoestrogeni negli organismi superiori sono noti sin dagli anni 40 quando furono identificati come causa di sterilità negli ovini. Anche nell'uomo sono state ipotizzate conseguenze sulla fertilità e sullo sviluppo sessuale, ma tale associazione, evidente negli animali, non è stata ancora chiarita. Più recentemente i fitoestrogeni hanno attratto l'attenzione dei ricercatori per i loro effetti non solo protettivi nei confronti di alcune patologie degenerative ma anche per gli effetti negativi, in particolare, quelli inerenti l'azione di interferenza nei confronti della tiroide. Questa osservazione è valida anche per i soggetti ipotiroidici e per le donne gravide nelle quali essi potrebbero essere artefici di problemi nello sviluppo fetale.

Interferenti di origine antropica

Tra gli interferenti endocrini di sintesi sono inclusi alcuni contaminanti quali gli inquinanti organici persistenti (Persistent Organic Pollutants, POP), ovvero sostanze che oltre a possedere proprietà tossiche, sono dotate di resistenza alla degradazione chimica e biologica con conseguente bioaccumulo, biomagnificazione e persistenza nell'ambiente. Essi sono soggetti al trasporto attraverso aria, acqua e terreno, e quindi si depositano anche in luoghi lontani dalla zona di emissione. Il dato più interessante è che nel gruppo degli IE di sintesi sono incluse anche le sostanze rilasciate negli alimenti dagli imballaggi e contenitori, fra questi il più noto è il bisfenolo A, una molecola oggi *estremamente diffusa*, i cui effetti di interferenza endocrina hanno allarmato, anche di recente, i consumatori. Pur non trattandosi di una molecola particolarmente ecopersistente, la grande quantità di BPA immessa continuamente nell'ambiente fa sì che il bisfenolo sia ormai praticamente onnipresente.

In una meta analisi del 2009 di K l e c k a et al., di determinazioni analitiche ambientali di BPA in ambienti acquatici, condotta per sviluppare una conoscenza statistica della contaminazione da bisfenolo A in ambienti acquatici in Nord America e in Europa, sulla base di un'analisi di osservazioni ponderate relative a 89 inchieste pubblicate tra il 1997 e 2007 (1068 osservazioni per il Nord America e 848 in Europa), BPA è stato segnalato a concentrazioni superiori al limite di rivelabilità nel 20-51% dei campioni di acqua dolce. Le concentrazioni mediane di BPA per le acque dolci superficiali per il Nord America e l'Europa sono state 0,081 e 0,01 mg / L.

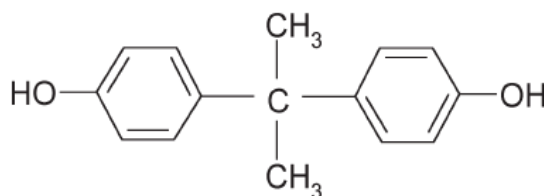
Per i sedimenti d'acqua dolce del Nord America su 71 osservazioni, le concentrazioni mediane sono state di 0,6 e 3,4 ng / g-dw, rispettivamente, in Europa, su 249, erano 16 e 256 ng / g-dw.

2.2 Il bisfenolo A e suoi derivati: caratteristiche chimico-fisiche, volumi di produzione industriale e applicazioni.

Caratteristiche chimico-fisiche

Bisfenolo A (CAS 80-05-07) è il nome comune del 2,2-bis(4-idrossifenil)propano (V. Figura 2.1). E' un composto organico con formula chimica $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ appartenente alla classe dei bisfenoli, composti chimici con due gruppi funzionali idrossifenilici. Si presenta in forma di cristalli o polvere cristallina, fiocchi o granuli di colore da bianco a nocciola chiaro, solubile nei comuni solventi organici ma scarsamente in acqua.

Figura 2.1



Il Bisfenolo A è stato sintetizzato dal russo A.P. Dianin nel 1891.

Viene preparato tramite la condensazione di una mole di acetone (da cui il suffisso A nel nome chimico comune) con due moli di fenolo; la reazione è catalizzata da un acido, come l'acido cloridrico (HCl) o una resina polistirenica solfonata. Nella pratica un largo eccesso di fenolo garantisce una buona resa della reazione di condensazione.

Anche se il bisfenolo A è il più diffuso ed impiegato nell'industria per le sue applicazioni tecnologiche, sono noti numerosi altri bisfenoli tra cui:

- **bisfenolo F** (CAS 87139-40-0) nome comune del Bis(4-idrossidifenil)metano, prodotto della condensazione del fenolo con la formaldeide

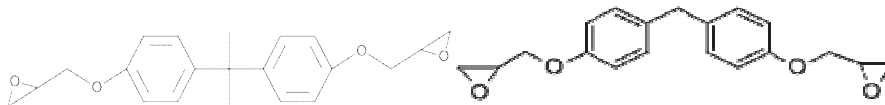
- **bisfenolo S** (CAS 80-09-1) nome comune del bis(4-idrossifenil)sulfone, prodotto di condensazione tra fenolo e triossido di zolfo; tra l'altro, come si vedrà quest'ultimo composto viene proposto, tra varie critiche, come sostituto del BPA.

Composti derivati del BPA e del BPF molto frequentemente impiegati sono:

- **BADGE** (CAS 1675-54-3) acronimo inglese del diglicidil etero del bisfenolo A, nome comune del 2,2-bis(4-(2,3 epossipropil)fenil)propano sintetizzato per reazione del bisfenolo A con epicloridrina, utilizzato in circa il 75% delle resine epossidiche.
- **BFDGE** (CAS 2095-03-6) diglicidil etero del bisfenolo F nome comune del bis(4-glicidioxyphenyl)metano, entrambi considerati tossici.

Il rivestimento interno dello scatolame metallico, di solito a base di resine epossifenoliche, è spesso il prodotto di polimerizzazione del BADGE o del NOGE (Novolac Glycidyl Ethers); di quest'ultimo il componente a più basso peso molecolare è il BFDGE.

Figura 2.2



Struttura del BADGE

Segue alle pagg.27-28 una tabella riassuntiva con le principali caratteristiche del bisfenolo A:

Tabella 2.1

BISFENOLO A	
Nome IUPAC	2,2-bis(4-idrossifenil)propano
Alcuni sinonimi ed acronimi	BPA, DPP, 4,4'-bisfenolo A, difenilolpropano

CAS number	80-05-7 [1]
Formula bruta o molecolare	$C_{15}H_{16}O_2$
Massa molare	228.29 g mol ⁻¹
Aspetto fisico	Polvere, granuli o fiocchi di colore da bianco a nocciola chiaro
Densità	1.20 g cm ⁻³ , solido
Punto di fusione	155 -159 °C (431-432) K
Punto di ebollizione	220 °C a 5 hPa - lit. (MSDS Sigma) 398 °C at 101.3 kPa, Cousins et al. (2002)
Flash point	227 °C
Coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua	log Pow: 3,32
Solubilità in acqua	120–300 ppm (a 21.5 °C, 300 ppm a pH 7) via Staples et al.
Costanti di dissociazione acida	pK _{a1} 9.6; pK _{a2} 10.2 (Kosky, Guggenheim, 1991) pK _{a1} 9.9; pK _{a2} 11.3 (Rykowska, Wasiak, 2006)
FRASI DI RISCHIO	R36 R37 R38 R43; S24 S26 S37
A meno che non sia diversamente indicato, i dati si riferiscono allo stato standard (25 °C, 100 kPa)	

Volumi di produzione industriale e applicazioni

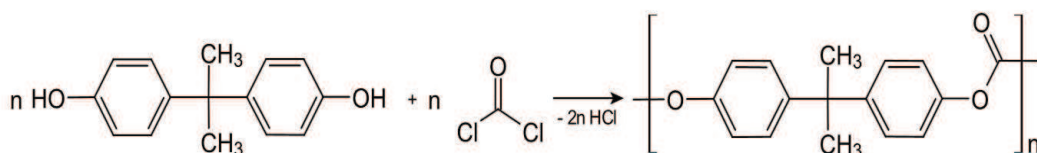
Il bisfenolo A è una delle sostanze chimiche con il più elevato volume di produzione (Burridge (2003), Staples et al., (2002)). La produzione mondiale del BPA, che era di circa 1 milione di tonnellate negli anni 80, è più che raddoppiata nel 2009 e la Global Industry

Analysts, Inc., report MCP-6349 del 2010, prevede, per il 2015, di oltrepassare i *6,3 milioni di tonnellate*.

Il Bisfenolo A è usato principalmente per la produzione di plastiche ed i suoi derivati sono, secondo quanto riportato in "Bisphenol A Information Sheet" del Global Industry Group. October 2002., in commercio fin dal 1957.

È utilizzato nella sintesi del poliestere, dei polisolfonati, dei chetoni polieteri, come antiossidante in alcuni plastificanti, colle, inchiostri e come inibitore della polimerizzazione del PVC. È un monomero chiave nella produzione delle **resine epossidiche** e nelle più comuni forme di **policarbonato**. Di quest'ultimo se ne riporta di seguito lo schema della reazione di polimerizzazione:

Figura 2.3



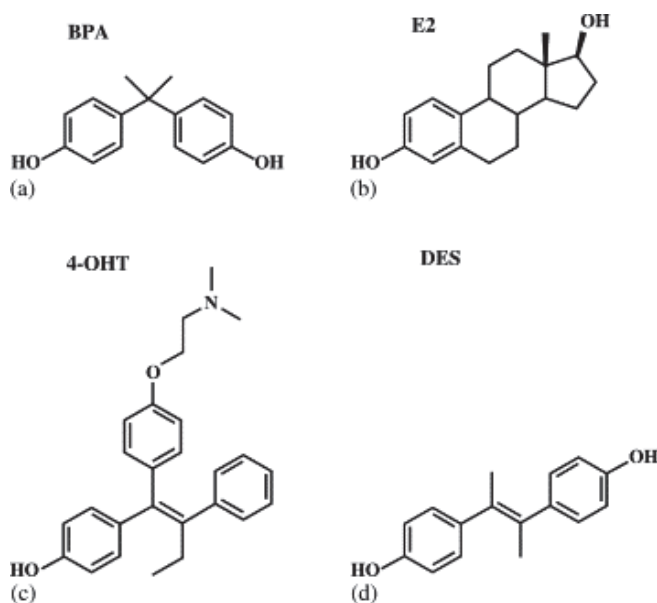
Il **policarbonato**, dalle eccezionali proprietà – leggerezza, durabilità, alta resistenza alla trazione, alto modulo di elasticità, elevato punto di fusione, ed alta temperatura di transizione vetrosa, essendo pressoché infrangibile, è usato per un gran numero di prodotti per bambini, bottiglie, attrezzature sportive, dispositivi medici per la dialisi e l'ossigenazione del sangue ed odontoiatrici, lenti per gli occhiali, supporti ottici, elettrodomestici, caschi di protezione, otturazioni dentarie ed ovunque siano necessarie caratteristiche di durezza e resistenza ,oltre che trasparenza. Le resine epossidiche che contengono bisfenolo A e suoi derivati come il BADGE sono, invece, utilizzate come rivestimento interno nella maggior parte delle lattine per alimenti e bevande. Il Bisfenolo A è anche un precursore per ritardanti di fiamma, il tetrabromobisfenolo A, ed era anche usato come fungicida anticrittogamico.

Il BPA si trova nella *carta termica* (per scontrini) sotto forma di monomero libero, di conseguenza il rilascio e l'assorbimento possono essere più facili rispetto al BPA presente, ad esempio, negli imballaggi per cibi. Tuttavia l'uso di carta termosensibile non è limitato agli scontrini: si può trovare anche nella carta per fax e nelle etichette autoadesive.

2.3 Effetti biologici del bisfenolo A

Per molti anni il BPA è stato trattato come innocuo (*neutral*) per la salute umana. Le prime evidenze dell'interazione ormonale del BPA vengono dagli esperimenti condotti sui ratti effettuati negli anni trenta (Dodds 1936). L'attività estrogenica di BPA è stata la prima volta nel 1993 (Krishnan, A.V., et al.) ma bisogna attendere il 1997 per avere prove sugli effetti avversi delle esposizioni anche a bassi dosaggi su animali da laboratorio. Da allora, le interazioni con il sistema endocrino sono state indagate e sono stati pubblicati sull'argomento numerosissimi studi. **Una ricerca lanciata a fine marzo 2013, con il motore di ricerca FedOA dell'Università Federico II alla voce "bisphenol A" restituisce oltre 62000 occorrenze relative a pubblicazioni accademiche e più di 2000 a libri.** Numerosi studi tossicologici e biochimici hanno confermato che il bisfenolo A ha *proprietà estrogeniche* e un *effetto competitivo* verso il *recettore estrogenico*; la sua *attività estrogenica* si esplica anche a *concentrazioni inferiori a 1 ng L⁻¹* (cfr. la review di Vom Saal, C. Hughes, 2005). Di seguito si riportano, per confronto, le strutture del BPA e quelli di alcuni ormoni estrogeni: (a) bisfenolo A (BPA), (b) 17 β -estradiolo (E2), (c) 4-idrossitamoxifene (4-OHT), and (d) dietilstilbestrolo (DES):

Figura 2.4



da: "Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity", Sayaka Takayanagi, et al.

L'affinità di BPA per i recettori degli estrogeni è stata valutata in 10.000 - 100.000 volte più debole di quella dell' estradiolo, quindi è stato considerato uno xenoestrogeno molto debole. Tuttavia, è stato dimostrato che anche a bassissime dosi (ppt, parti per miliardo) è in grado di bloccare la sintesi del testosterone (Akingbemi, et al., 2005).

Il problema della dose giornaliera tollerabile (TDI)

Tutta la nuova letteratura scientifica, concernente gli effetti a basse dosi del BPA, ha dato luogo a controversie con le agenzie per la protezione della salute dei consumatori sui valori limite, fissati dalla normativa sul BPA, e ciò ha fatto scaturire l'esigenza di una nuova valutazione del rischio e consigliato fortemente di rivedere la TDI (Tolerable Daily Intake). Attualmente, la dose giornaliera tollerabile fissata dalla Commissione europea e il riferimento dose (RfD), istituita dall' EPA è di **0,05 mg BPA / kg peso corporeo / giorno**. Questo valore è 100 volte inferiore al valore attualmente accettato del "No Observed Adverse Effect Level" (NOAEL) per il BPA che è di 5 mg/kg. D'altra parte, è stato fissato per il BPA, dalla Commissione europea, nel 2004 un limite di migrazione specifica (LMS) per la plastica a contatto con gli alimenti materiali di 600 ng g⁻¹ (0,6 mg kg⁻¹). Questo limite si riferisce però ad effetti acuti di altre patologie (diabete, malattie cardiovascolari) e non a quelli endocrini. Molteplici e controversi sono gli effetti deleteri di cui viene accusato il BPA. Secondo una ricerca apparsa sulla rivista "Endocrinology" nel 2005, il BPA potrebbe avere ripercussioni nello sviluppo del sistema nervoso dei bambini; nello stesso anno, ricercatori dell'University of Cincinnati (Usa) hanno correlato la comparsa di alcuni gravi disturbi neurologici infantili, all'esposizione al BPA, anche a dosi molto basse.

Inoltre secondo altri studi, il bisfenolo potrebbe indurre tumori, al seno, prostatici ed predisposizione al diabete, malattie cardiache, disfunzioni tiroidee, problemi all'impianto embrionale nell' utero e nello sviluppo postnatale.

Ma, negli adulti, i problemi più preoccupanti pare siano quelli andrologici. Di recente una ricerca pubblicata sulla rivista "Human reproduction" e sul "Journal of Andrology" (D. Li et al., 2009 e 2010) ha evidenziato una connessione epidemiologica tra l'incremento dei casi di impotenza maschile e l'esposizione al BPA. L'indagine è stata

condotta a Shanghai su 230 operai cinesi presso industrie che lavorano materiale plastico e su un campione di controllo di 404 concittadini, non esposti nelle loro attività lavorative. La ricerca ha mostrato che i dipendenti delle fabbriche di BPA sono quattro volte più soggetti a disfunzione erettile e calo del desiderio sessuale e sette volte più portati ad avere difficoltà di eiaculazione rispetto agli altri; infatti, come sottolineato dagli stessi autori, i livelli di esposizione degli operai della fabbrica di BPA sono 50 volte superiori a quelli medi cui è esposta la popolazione di Shanghai. Secondo alcuni il BPA sarebbe inoltre coinvolto, almeno in parte, nell'inarrestabile declino dell'indice di fertilità maschile che, pur negato da talune meta analisi di dati, (Vanderschueren, 1999), si osserva da alcuni decenni.

2.4 Fonti di esposizione alimentari e non.

Nonostante l'ampia diffusione degli IE, secondo i ricercatori la più importante fonte di esposizione per l'uomo e per gli animali è la **via alimentare**; il ruolo delle vie inalatoria e dermica, parrebbe meno rilevante nonostante studi piuttosto recenti confermino come l'assorbimento cutaneo del BPA sia più rilevante di quanto supposto (Zalko D et.al. 2011) e che le concentrazioni urinarie di BPA nei soggetti che maneggiano quotidianamente scontrini di carta termosensibile sono maggiori della media (Braun et al., 2011).

Gli interferenti endocrini una volta ingeriti con gli alimenti, attraversano le membrane cellulari, raggiungendo il torrente circolatorio e, trasportati dal sangue, si distribuiscono in organi e tessuti. Alcuni, non essendo eliminati dall'organismo, permangono "immagazzinati" in queste sedi aumentando in conseguenza del ripetersi dell'esposizione (*bioaccumulo*).

Per quanto concerne l'uomo, essendo la sua dieta onnivora ed estremamente variegata, i livelli di IE nella popolazione variano considerevolmente. Il passaggio di BPA dai recipienti agli alimenti è strettamente dipendente dalla temperatura, dal pH, dalla storia termica, meccanica e dalla vetustà dei contenitori nonché dalla natura chimica degli alimenti o delle sostanze chimiche con esso in contatto.

Sebbene gli studi non siano concordi, secondo alcuni ricercatori, i contenitori per bevande e nei quali vengono riposti liquidi ad alte temperature continuerebbero a rilasciare BPA ad elevate concentrazioni, anche dopo il raffreddamento.

Si spiega con le innumerevoli applicazioni tecnologiche del BPA perché l'esposizione al BPA è molto diffusa, essendo questa molecola ormai addirittura ubiquitaria, come ha

efficacemente segnalato Walsh: *"The problem is, BPA is also a synthetic estrogen, and plastics with BPA can break down, especially when they're washed, heated or stressed, allowing the chemical to leach into food and water and then enter the human body. That happens to nearly all of us; the CDC has found BPA in the urine of 93% of surveyed Americans over the age of 6"...* **"If you don't have BPA in your body, you're not living in the modern world."** Walsh B. The Perils of Plastic – Environmental Toxins – TIME. Time. 1 April 2010 (cited 2 July 2010).

Tuttavia ci sono anche **altre fonti non alimentari** di uso comunissimo che, sommandosi alle altre, possono portare ad una significativa esposizione.

Anche un altro luogo comune scientifico sul BPA è stato messo in discussione da uno studio su circa 1500 partecipanti che ha evidenziato, invece, una emivita del BPA più lunga del previsto, probabilmente a causa delle continue e reiterate esposizioni attraverso le diverse fonti, **alimentari e non**, nonché di una certa persistenza nei tessuti corporei (Stahlhut RW, et al. 2009). Come viene segnalato da Mantovani e Baldi dell'ISS in una rassegna di letteratura, l'effetto estrogenizzante di **sigillanti dentali polimerici** è dimostrato da due studi che attestano un *"significativo"* rilascio di monomeri dai materiali compositi. Questa fonte di BPA sebbene relativamente poco diffusa è sicuramente una fonte non alimentare assai rilevante dal punto vista dei livelli di BPA per i soggetti esposti.

Il problema della sostituzione del BPA nelle applicazioni tecnologiche ed i materiali cosiddetti BPA-free.

L'estrema versatilità chimica del bisfenolo A e la sua ormai radicata presenza in molti strategici processi industriali rende non facile la sua sostituzione; le industrie hanno risposto alle critiche e alle crescenti preoccupazioni sull'uso del BPA, oltre che alle restrizioni sempre più frequenti, con la creazione di prodotti "BPA-free", che sono fatti da plastica contenente il bisfenolo S (BPS), già descritto prima e che condivide con il BPA struttura simile e versatilità, viene utilizzato, anche ad esempio nella produzione di carta termica per scontrini per la sua efficacia (Mendum, Stoler et al. 2011). Anche molti scontrini di carta termica cosiddetti esenti da BPA (BPA-free) hanno mostrato contenuti di bisfenolo A dell'ordine dei µg/g.

Tuttavia, secondo uno studio del 2012, anche il BPS causa problemi simili al BPA, in quanto è stato trovato essere anch'esso un distruttore endocrino, anche a livelli molto bassi di esposizione. Nel 2011 secondo un altro studio (Zalko et al.) le persone che operano ai registratori di cassa ricevute di carta termica sono esposte ad alti livelli di BPS. I ricercatori

hanno scoperto BPS in tutta la carta delle ricevute e nell' 87 per cento dei campioni di carta moneta e nel 52 per cento di carta riciclata. Lo studio ha trovato che le persone possono assorbire attraverso la pelle 19 volte più BPS rispetto alla quantità di BPA che hanno assorbito quando quest'ultimo era più largamente usato.

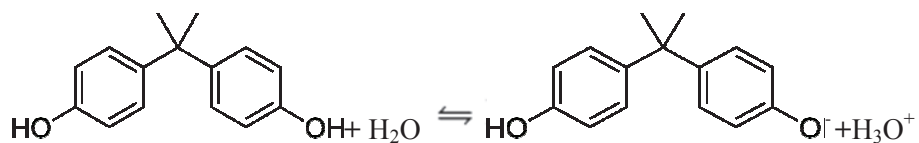
Capitolo 3 La determinazione analitica del BPA.

3.1 Studio preliminare delle proprietà acido-base del sistema bisfenolo A-H₂O

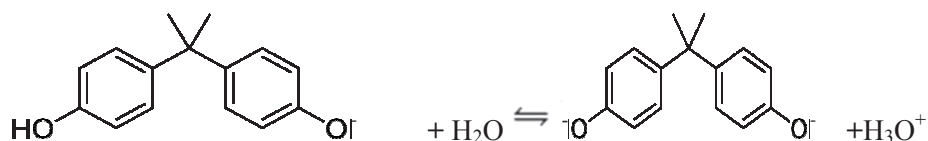
La solubilità ed il comportamento chimico del BPA, una molecola protolitica, sono profondamente condizionati dalla concentrazione idrogenionica. Allo scopo di valutare le costanti di dissociazione acida e confrontare i valori acquisiti con quelli riportati in letteratura ci si è posti il problema della relativa determinazione. Cadendo le costanti di letteratura in campo nettamente alcalino e stante la difficoltà di acquisire a queste concentrazioni idrogenioniche, con la necessaria esattezza, i valori del pH con il classico elettrodo a vetro – il che rende non praticabile la tecnica della titolazione potenziometrica – si è sfruttata la notevole assorbività della molecola nella regione dell'ultravioletto.

Materiali e metodo operativo.

Le misure sono state eseguite con uno spettrometro doppio raggio UV-2401 PC UV-VIS della SHIMADZU; i reagenti adoperati di qualità analitica, idonei per spettrometria UV. L'acqua ultrapura utilizzata per le diluizioni è ottenuta, per osmosi inversa, da apparecchiatura Millipore e controllata avere un'assorbanza, nel range di misura spettrale, inferiore a 0,010 in cuvetta da 10 mm. Sono stati acquisiti spettri nell' UV del sistema BPA-H₂O al variare del pH, in un' intervallo compreso tra 1 e 12. Nell'intervallo di pH esplorato, la molecola è coinvolta nei seguenti equilibri acido-base:



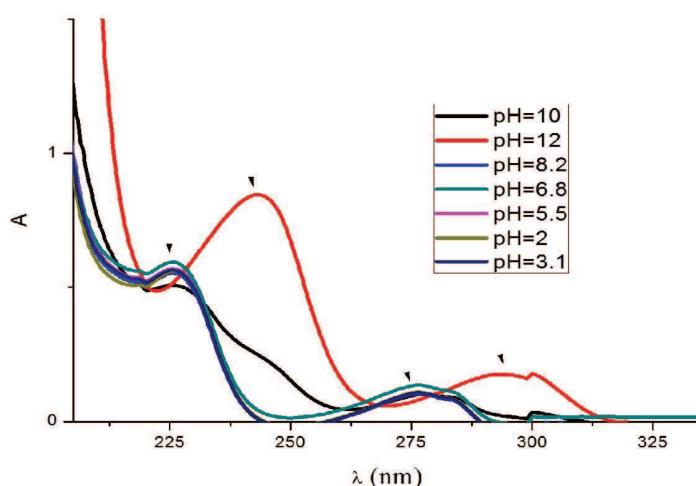
$$K_{a1} = [\text{BPA}^-] [\text{H}_3\text{O}^+] [\text{BPA}]^{-1}$$



dove alla reazione precedente è associata la : $K_{a2} = \frac{[BPA^2-][H_3O^+]}{[BPA^-]}$

Lo studio è stato effettuato in KCl 0.1M, a 25.0 ± 0.1 °C. L'intervallo di concentrazioni di BPA indagato è $30 \cdot 10^{-6} M < C < 60 \cdot 10^{-6} M$. L'acidità delle soluzioni è stata variata mediante aggiunte note di soluzioni di KOH 1M, il pH è misurato mediante un pH-metro fornito dalla Hanna; l'elettrodo di misura un elettrodo a vetro combinato con elettrodo di riferimento Ag/AgCl/Cl⁻. In figura 3.1 sono riportati gli spettri UV a diversi valori di pH ottenuti nel corso di un tipico esperimento:

Figura 3.1

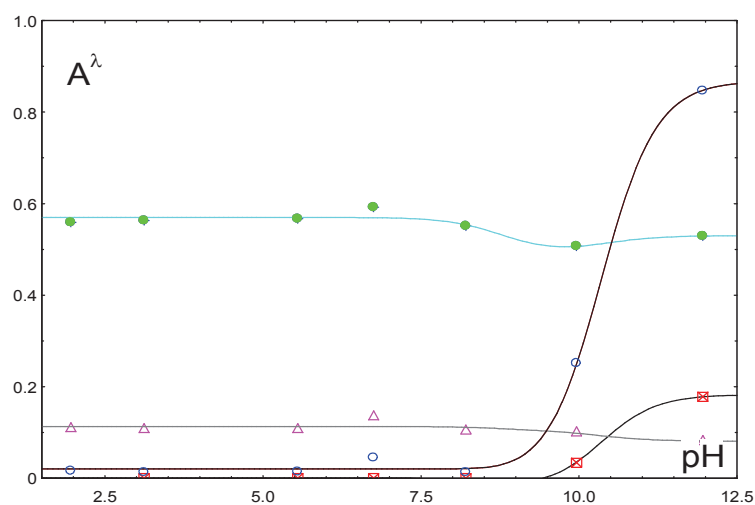


Un attento esame degli spettri riportati evidenzia la presenza delle bande etileniche (E e K) e benzenoide (B), tipiche di un sistema aromatico. Le bande E e K (184, 204 nm) e quella benzenoide (254 nm) risultano spostate a lunghezze d'onda maggiori (effetto batocromico) per la presenza di sostituenti sugli anelli aromatici.

Non si osservano variazioni rilevanti nel pattern di assorbimento per valori di $2 < \text{pH} < 7$. In questo intervallo la specie predominante è BPA. Gli spettri testimoniano, invece, un cambiamento radicale nel passaggio da un pH 8 ad un pH 12. Tale cambiamento deriva dalla diversa distribuzione rispettivamente delle specie neutra e quelle con cariche negative derivanti dalla perdita dei due protoni fenolici.

I valori di A^λ alle lunghezze d'onda di maggiore interesse, in corrispondenza delle quali si osservano dei massimi di assorbimento sensibili alle variazioni di acidità della soluzione ($\lambda = 226 \text{ nm}, 244 \text{ nm}, 276 \text{ nm}$ e 294 nm , indicati mediante frecce nella figura 2.3), sono stati riportati in funzione del pH. Ne risulta il seguente grafico dove i colori dei punti riportati si riferiscono alle lunghezze d'onda succitate.

Grafico 3.1



Le coppie di valori ottenute (A^λ / pH) sono state interpolate con una funzione che lega l'assorbanza al pH e alla concentrazione analitica di BPA, secondo la legge delle additività:

$$A^\lambda = l \cdot (\epsilon_1^\lambda [\text{BPA}] + \epsilon_2^\lambda [\text{BPA}^-] + \epsilon_3^\lambda [\text{BPA}^{2-}])$$

dove l è la lunghezza del cammino ottico (1 cm) e ϵ_1^λ , ϵ_2^λ , ϵ_3^λ sono i coefficienti di estinzione molare delle tre specie.

Il fitting dei dati ha permesso di ottenere gli ϵ_2^λ , coefficienti di estinzione molare, delle tre specie in equilibrio chimico e le costanti di dissociazione K_{a1} e K_{a2} valide nel mezzo ionico considerato, che sono esposti, con le relative incertezze di misura stimate, nella tabella che segue:

Tabella 3.1

λ (nm)	ϵ_1 (BPA) ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	ϵ_2 (BPA ⁻) ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	ϵ_3 (BPA ²⁻) ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
226	$(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(1.2 \pm 0.3) \cdot 10^4$
244	$(5.1 \pm 0.5) \cdot 10^3$	$(10 \pm 0.5) \cdot 10^0$	$(1.9 \pm 0.1) \cdot 10^4$
276	$(2.5 \pm 0.3) \cdot 10^3$	$(2.3 \pm 0.2) \cdot 10^3$	$(1.7 \pm 0.5) \cdot 10^3$
294	$(1 \pm 0.2) \cdot 10^2$	0.2 ± 0.1	$(4 \pm 0.4) \cdot 10^3$

I valori ottenuti sono congruenti con quelli tipici di molti composti fenolici.

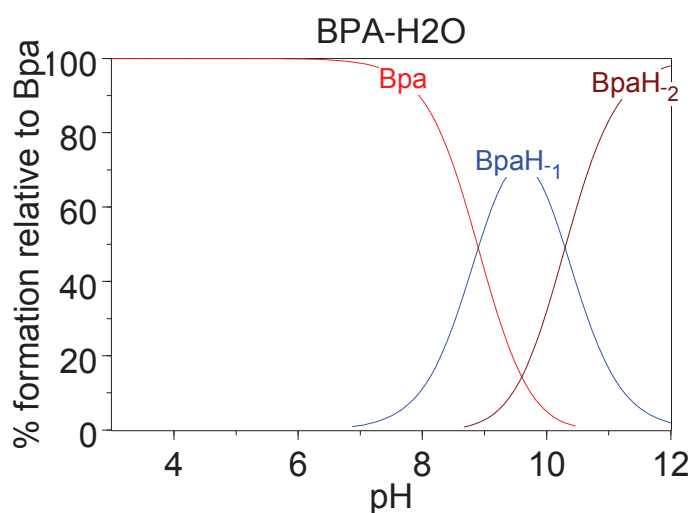
In tabella 3.2, in particolare, sono riportati gli equilibri con le rispettive costanti, valide in 0.1 M KCl, ottenute nel presente lavoro.

Tabella 3.2

Reazione	Costante	Valori di letteratura	Autori
$\text{BPA} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{BPA}^-$	$\log K_{a1} = (-8.9 \pm 0.1)$	$\text{pK}_{a1} 9.6$	Kosky, Guggenheim, 1991
		$\text{pK}_{a1} 9.9$	Rykowska, Wasiak, 2006
$\text{BPA}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{O}^+ + \text{BPA}^{2-}$	$\log K_{a2} = (-10.3 \pm 0.3)$	$\text{pK}_{a2} 10.2$	Kosky, Guggenheim, 1991
		$\text{pK}_{a2} 11.3$	Rykowska, Wasiak, 2006

In figura si riporta il diagramma di distribuzione del sistema BPA-H₂O costruito utilizzando le costanti di dissociazione riportate in tabella 2.3

Grafico 3.2



Dal diagramma di distribuzione si evince come, a pH circa 7 ed al disotto, il BPA non sia ionizzato ma si trovi essenzialmente come molecola neutra. La progressiva ionizzazione

della molecola con l'aumentare del pH, condiziona positivamente la sua solubilità in acqua oltre che la reattività con specie ioniche o con recettori polari con importanti conseguenze.

3.2 Valutazione della solubilità del bisfenolo A in acqua: confronto tra gravimetria e gascromatografia (GC-MS).

Allo scopo di confronto con i valori riportati in letteratura della solubilità del bisfenolo A in acqua sono stati condotti due esperimenti. Preparata una soluzione satura di BPA in acqua a temperatura controllata si è poi determinata la concentrazione di bisfenolo A con due metodologie.

Metodo gravimetrico.

Un eccesso di BPA della Sigma Aldrich, (purezza dichiarata 99,5%) era posto in agitazione mediante ancorretta magnetica rivestita in teflon con acqua, purificata per osmosi inversa, di qualità analitica alla temperatura di 20,0 °C, controllata mediante bagno esterno ultratermostatico. Dopo 48 ore di agitazione si è prefiltrata la sospensione con carta da filtro ordinaria scartando le prime frazioni di filtrato e perfezionando la filtrazione con membrana da 0,45 micrometri. Aliquote di circa 70 mL sono state evaporate a 80 °C fino a peso costante.

Si è riscontrato un valore di solubilità, alla temperatura di 20 °C, pari a 351 ± 5 mg/L (g m^{-3}) vicino a quello massimo riportato in letteratura (0,04% = 400 mg/L). La variabilità media osservata in letteratura, 100-300 mg/L, per molti autori, (Staples, Cousins, et al. l.c.) è forse da imputarsi alla notevole dipendenza della solubilità della molecola – un protolita- alla concentrazione idrogenionica ed alle diverse condizioni sperimentali di acquisizione.

Metodo gascromatografico GC-MS

Un' aliquota della medesima soluzione satura di BPA utilizzata per la valutazione gravimetrica è stata analizzata gascromatograficamente secondo la metodica descritta nel paragrafo successivo. E' risultata una concentrazione di BPA all'equilibrio pari a: $348.6 \pm 0,2$ mg/L.

3.3 Disamina dei metodi analitici in letteratura e messa a punto e validazione di due metodiche strumentali cromatografiche .

Una delle prime tematiche affrontate nel presente lavoro di tesi è stata la individuazione della o delle tecniche ottimali e dello sviluppo di metodologie per la determinazione del BPA. Il problema è stato affrontato a più riprese dalla comunità scientifica in alcune pubblicazioni esaustive, le più importanti delle quali pubblicate durante lo svolgimento della tesi ed una relativa alla messa a punto della metodologia analitica strumentale qui utilizzata (Troisi J., Di Fiore R., **Palumbo G.**, 2012)

Attese le bassissime concentrazioni in gioco (ppb o frazioni di ppb) e le caratteristiche chimiche dell'analita, la scelta si è dovuta orientare giocoforza su tecniche strumentali, a parte i test immunoenzimatici specifici, come l'ELISA, utilizzati per ricognizioni qualitative; inoltre la ubiquitarietà del bisfenolo A ha costretto gli studiosi a confrontarsi con una varietà di matrici anche molto complesse, alimentari e non, spaziando da varie tipologie di conserve alimentari a base acquosa oppure ricche in lipidi, bevande soft-drink oppure liquidi spiritosi fino, *last but not least*, alla fondamentale determinazione del BPA nelle matrici biologiche. Inoltre, non lievi problematiche sono state affrontate relativamente alla preparazione del campione come estrazione, purificazione, concentrazione, eventuale derivatizzazione, prima dell'analisi con tecniche come la gas-cromatografia (GC) e la liquido-cromatografia (LC) accoppiata con vari detector (spettrometro di massa MS, UV, fluorescenza, elettrochimica, etc.); tutte fasi richieste anche per un'analisi "qualitativa" di screening. Due ottime rassegne di metodi sono state particolarmente utili: una pubblicazione del WHO (Xu-Liang Cao, November 2010) e quella di Ballesteros-Gómez, et al. (Journal of Chromatography 2009)

La messa a punto e la validazione del metodo di determinazione del bisfenolo A si sono rivelati compiti assai delicati per la onnipresenza di questa molecola, anche in tracce, in molti reagenti e materiali di laboratorio (ad esempio le siringhe di vetro, a causa del mastice usato per fissare l'ago o le cartucce SPE per la estrazione dai campioni) già segnalata in letteratura e riscontrata anche nel presente lavoro di tesi. In generale la contaminazione operativa è dell'ordine dei ng L^{-1} ; in effetti si è riscontrata la presenza del BPA anche in solventi di qualità analitica e nei simulanti custoditi in taniche di materiale plastico, teoricamente esenti da BPA (513.21 $\mu\text{g/L}$ per il simulante B e 53.57 $\mu\text{g/L}$ per il simulante

C). Ciò ha costretto a riconsiderare l'intera catena di misura ,*verificando il contenuto di BPA estraibile da ogni materiale o reagente coinvolto* .

Sono stati messi a punto, dunque, un metodo per la determinazione del BPA in GC-MS usando il GC-MS Shimadzu QP2010P e un metodo basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa a singolo quadrupolo HPLC-MS, usando l'LC-MS Shimadzu LC2020. In entrambi i casi il limite di rilevabilità è risultato pari a 0,1 ug/L.

Condizioni operative

Il metodo gas-cromatografico è basato su una colonna SLB[®]-5ms della Supelco[®] da 15 m di lunghezza con un diametro interno di 0.1 mm e un film di 0.1 µm. Il programma termico prevede una prima fase di 1,5 minuti a 160 °C e due rampe di salita di cui *la prima* alla velocità di 20 °C/min fino a 260 °C e *la seconda* di 40 °C/min fino alla temperatura di 320 °C. La temperatura dell'iniettore è di 260 °C e la velocità lineare del gas di trasporto (Elio) è di 50 cm/sec. Questo settaggio comporta una pressione di oltre 700 kPa e un flusso in colonna di 0.86 ml/min. Il tempo totale di corsa è di 8 minuti e il tempo di ritenzione del BPA risulta 5.9 min. Questi rapidi tempi di analisi richiedono ovviamente elevate velocità di acquisizione. Sono stati utilizzati due canali di acquisizione uno in SIM ed uno in modalità SCAN tra m/z=50 e m/z=500, l'event time per la modalità SCAN è stato fissato a 0.1 secondi, il che comporta una velocità di scansione di 5000 amu/sec (che è la metà della velocità massima raggiungibile con il QP2010). In SIM sono stati monitorati gli ioni m/z=213 e m/z=228 per il BPA e m/z=224 per lo standard interno.

La curva di calibrazione è stata costruita mediante 8 soluzioni standard di BPA a concentrazione compresa tra 0.1 ug/L e 1000 ug/L. Il metodo si è rivelato estremamente sensibile e dinamico. La calibrazione è stata ottenuta mediante l'utilizzo di uno standard interno marcato (BPA-d16).

Il metodo liquido-cromatografico, invece, è basato su una colonna Shim-Pack XR-ODS di 50 mm di lunghezza e 2 mm di diametro. L'eluizione è stata condotta in gradiente Acqua/Metanolo, il programma di eluizione prevede una prima fase di 1 minuto al 20% di metanolo, poi una salita fino al 50% in 5 minuti e un'altra rampa fino al 100% in altri 5 minuti, quindi un ritorno alle condizioni iniziali (20% di metanolo) in altri 2 minuti e infine 3 minuti di riequilibrio. L'intera corsa dura 15 minuti. Il flusso è stato fissato a 0.2 ml/min. Anche in questo caso l'acquisizione è stata condotta sia in modalità SCAN

(monitorando gli ioni negativi) tra $m/z=180$ e $m/z=480$ sia in modalità SIM (ioni negativi) $m/z=227.20$ e $m/z=241.30$. L'interfaccia è settata a -3.5 kV, il DL a 250°C e a 0 V, il QArray DC a 0 V, il QArray RF a 35 V, il detector a -1.15 kV. Il gas di nebulizzazione è fissato a 1.5 L/min. La possibilità di quantificare il BPA con elevata sensibilità ed amplissimo range dinamico, sia in GCMS che in LCMS, è un presupposto indispensabile per l'analisi di diverse matrici a concentrazioni molto basse e variabili. Di seguito si riportano alcuni significativi grafici, relativi alle tecniche in questione.

Figura 3.2 Gascromatogramma di uno standard di BPA e BPA-d16

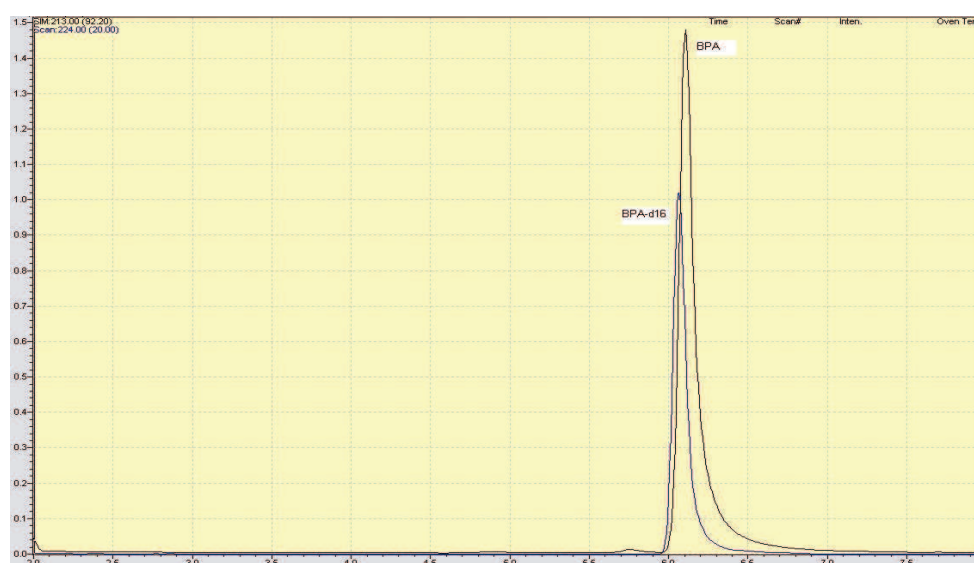


Figura 3.3 Spettro di massa del BPA

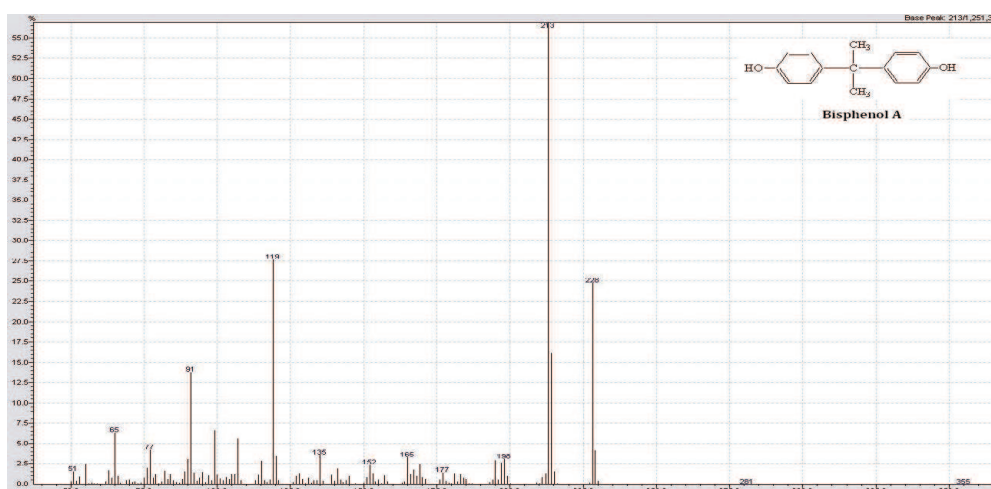


Figura 3.4 Spettro di massa del BPA-d16

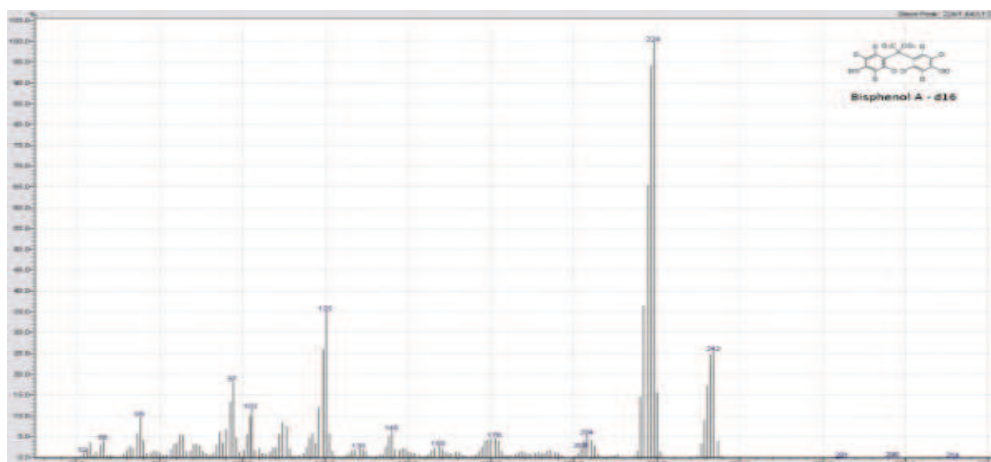


Figura 3.5 Curva di calibrazione gascromatografica del BPA

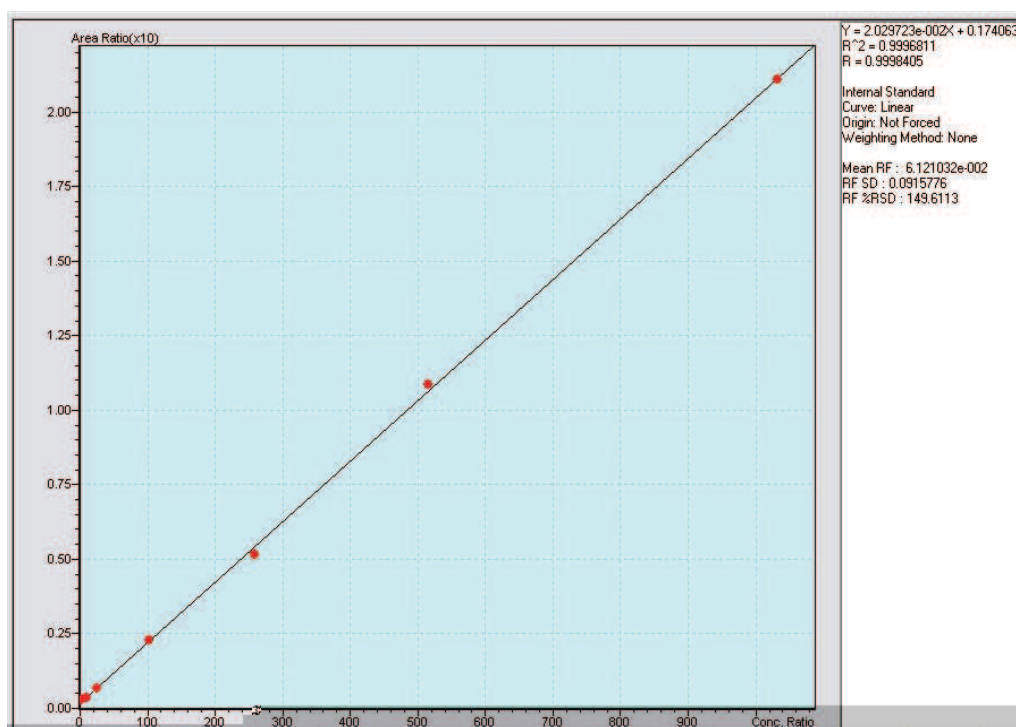
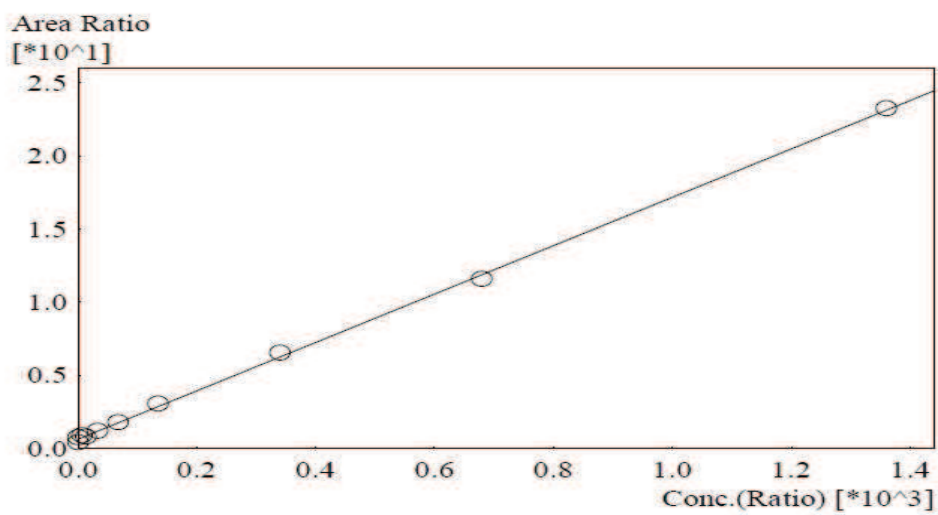


Fig. 3.6 Cromatogramma LC-MS di uno standard di BPA e BPA-d16



Figura 3.7 Curva di calibrazione LC-MS del BPA



Capitolo 4 Applicazione delle metodiche di analisi ad una tipologia di packaging modello con l'uso dei simulanti.

4.1 Estraibilità del bisfenolo A: prove di estrazione a vari pH con solventi

Allo scopo di valutare le solubilità del BPA, a scopo analitico, in mezzi di vario momento dipolare e acidità sono stati condotti alcuni esperimenti di ripartizione in coppie di solventi facendo variare l'acidità.

Sono state condotte prove di ripartizione del BPA in **due diversi sistemi bifasici: Acqua-Metanolo 50/50 v/v Vs n-esano; Acqua Vs n-esano** a diverse condizioni di pH. Il BPA è stato sciolto nella fase più polare alla concentrazione di 50 mg/L. È stato quindi addizionato n-esano alla fase polare in rapporto 1/1 v/v e la miscela è stata agitata vigorosamente per 3 ore in modo da consentire una completa ripartizione del BPA tra le fasi. Successivamente l'agitazione è stata interrotta e il tutto lasciato a riposo per 30 minuti fino a completa separazione. Il BPA presente in fase esanica è stato quantificato mediante GC-MS. Preliminarmente alla estrazione del BPA le fasi polari sono state corrette a 6 diversi valori di pH (pH=2,0 pH=4,0 pH=7,0 pH=8,0 pH=10,0 e pH=12,0) mediante HCl 0.1N e 0.5N e NaOH 0.1N e 0.5N. Le prove condotte e i risultati sono riassunti in tabella 4.1 e 4.2 e grafico 4.1.

In un primo esperimento sono state preparate 6 soluzioni di acqua a pH=2,0 pH=4,0 pH=7,0 pH=8,0 pH=10,0 e pH=12,0 e sciolti 50 mg di BPA in una miscela di 25 mL ciascuna di queste soluzioni e 25 mL di metanolo. Si sono poi aggiunti 50 mL di n-esano e la miscela è stata vigorosamente agitata per 60 minuti, quindi la fase esanica separata per centrifugazione e iniettata in GC-MS secondo il metodo sopra indicato.

A causa dei problemi nella misura del pH, essendo l'elettrodo combinato a vetro concepito essenzialmente per misurare pH di soluzioni acquose, si è eliminato totalmente il metanolo effettuando, quindi, un esperimento con BPA sciolto in sola acqua e partendo da una soluzione alla concentrazione, in BPA, di 50 mgL⁻¹ e reiterando la procedura già descritta utilizzando però, in questo caso, la sola soluzione acquosa ed aggiungendo alcune soluzioni a differenti pH.

Tabella 4.1

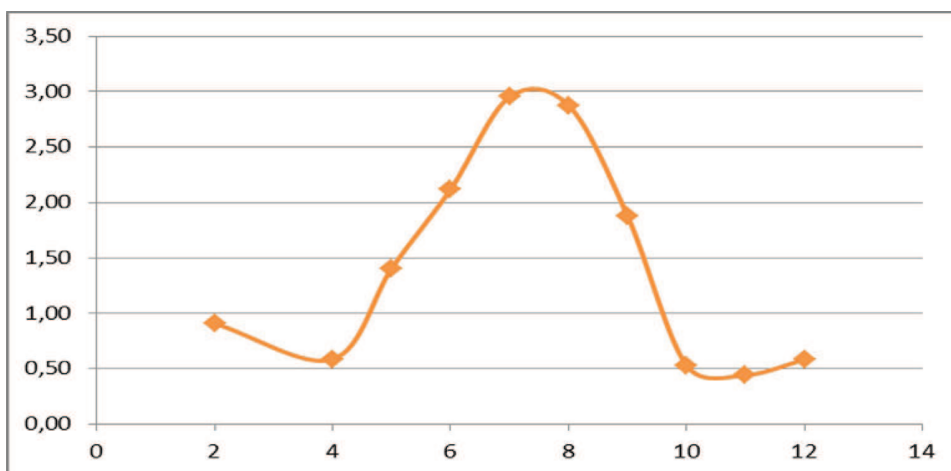
Ripartizione in metanolo-acqua 50 % v/v / n-esano			
pH	Conc. BPA nel n-esano	Fase esanica	Fase acquosa
	ppb	% del BPA iniziale	% del BPA iniziale
2,0	1860,17	0,19	99,81
4,0	2678,09	0,27	99,73
7,0	1067,34	0,11	99,89
8,0	1492,18	0,15	99,85
10,0	1957,95	0,20	99,80
12,0	83,73	0,01	99,99

Tabella 4.2

Ripartizione in acqua/n-esano			
pH	Conc. BPA nel n-esano	Fase esamica	Fase acquosa
	ppb	% del BPA iniziale	% del BPA iniziale
2,0	453,82	0,91	99,09
4,0	293,35	0,59	99,41
5,0	703,08	1,41	98,59
6,0	1059,88	2,12	97,88
7,0	1476,54	2,95	97,05
8,0	1438,17	2,88	97,12
9,0	938,69	1,88	98,12
10,0	264,87	0,53	99,47
11,0	221,85	0,44	99,56
12,0	291,21	0,58	99,42

“Il grafico che segue mostra chiaramente un massimo di estraibilità del BPA a pH 7 tuttavia, l'andamento inatteso, nell'ipotesi delle sole due specie cariche negativamente potrebbe far sospettare la protonazione del bisfenolo; in tal caso, aumentando l'acidità, la crescente ionizzazione positiva spiegherebbe la concomitante diminuzione di solubilità in n-esano.”.

Grafico 4.1



La questione meriterebbe ulteriori approfondimenti ...

4.2 Studio di cessione del bisfenolo A da scatolame metallico con rivestimento interno a base di BPA

Allo scopo di valutare l'entità della contaminazione degli alimenti a contatto con scatolame metallico, rivestito con lining interno non BPA-free, ci si è procurati presso una nota Azienda multinazionale produttrice di scatolame metallico per conserve alimentari, un numero congruo di lattine metalliche semifinite, mai state a contatto con alimenti ed appartenenti ad un lotto omologo. Si sono adottati per lo più i simulanti previsti dalla vigente normativa con l'aggiunta di un simulante ad elevato pH, non normato, nettamente alcalino. Per la scelta delle condizioni ci si è ispirati all'ambito normativo del Regolamento (UE) N. 10/2011 della commissione (allegato V) e discusso nel nostro Capitolo 2; i tempi adottati sono: 5 min., 15 min., 0,5 ore, 1 ora, 2 ore, 6 ore, 24 ore, 3 giorni, 10 giorni; e tra le temperature disponibili sono state scelte per la realizzabilità pratica: 20, 40, 70 °C, ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) Il volume di simulante a contatto con il rivestimento è di $350 \pm 0,1$ mL. Le lattine sono state opportunamente sigillate e poste in termostato alla temperatura prevista. Agli intervalli di tempo scelti è stato fatto un microprelievo di 100 μL di soluzione, rimpiazzato con altrettanto simulante fresco, e controllando il peso del contenitore + simulante per escludere il pericolo di perdite per evaporazione; nel caso la perdita rimpiazzata con simulante fresco fino a ripristino del peso iniziale. Dei simulanti disponibili nell'allegato III del Regolamento 10/2011 sono stati scelti quello B (acido acetico

al 3%) e quello C (etanolo al 20%) più il **simulante alcalino denominato X** e costituito da una soluzione acquosa a pH 12, al fine di riprodurre condizioni estreme di lavaggio di recipienti con detergenti alcalini (un tampone a pH superiore al pK_{a2} del BPA). Il simulante C è stato scelto per interpretare condizioni limite di polarità del mezzo (il BPA è, infatti, notevolmente solubile in alcool). I microprelievi sono stati analizzati in GCMS secondo la nota procedura. La concentrazione di BPA in soluzione è riportata in tabella 4.3, 4.4. e 4.5 ed nei grafici 4.2, 4.3 e 4.4. I valori espressi sono la media aritmetica delle concentrazioni (il limite di rivelabilità è $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) riscontrate sui tre contenitori.

Tabella 4.3

<i>Prova condotta a 20°C</i>				
		Simulante B	Simulante C	Simulante X
Data	Tempo (min)	Conc ($\mu\text{g/L}$)	Conc ($\mu\text{g/L}$)	Conc ($\mu\text{g/L}$)
12/03/2013	5	0,0	0,1	0,2
12/03/2013	15	0,2	0,8	0,4
12/03/2013	30	0,6	1,7	0,7
12/03/2013	60	0,8	2,9	1,6
12/03/2013	180	1,2	4,9	3,7
12/03/2013	360	3,4	6,8	4,8
13/03/2013	1440	3,6	8,1	6,2
14/03/2013	2880	3,5	8,0	5,9
15/03/2013	4320	3,4	7,9	5,8
19/03/2013	10080	3,6	8,8	6,2
22/03/2013	14400	3,4	9,0	6,5

Di seguito si riportano i grafici delle risultanze analitiche di cui alla tabella 4.3; nei grafici sottostanti, per tutti e tre gli esperimenti a varie temperature, allo scopo di evidenziare

meglio graficamente l'andamento nelle fasi iniziali dell'azione dei simulanti, si è espansa la scala delle ascisse riportando i punti precedenti la fase di plateau.

Grafici 4.2

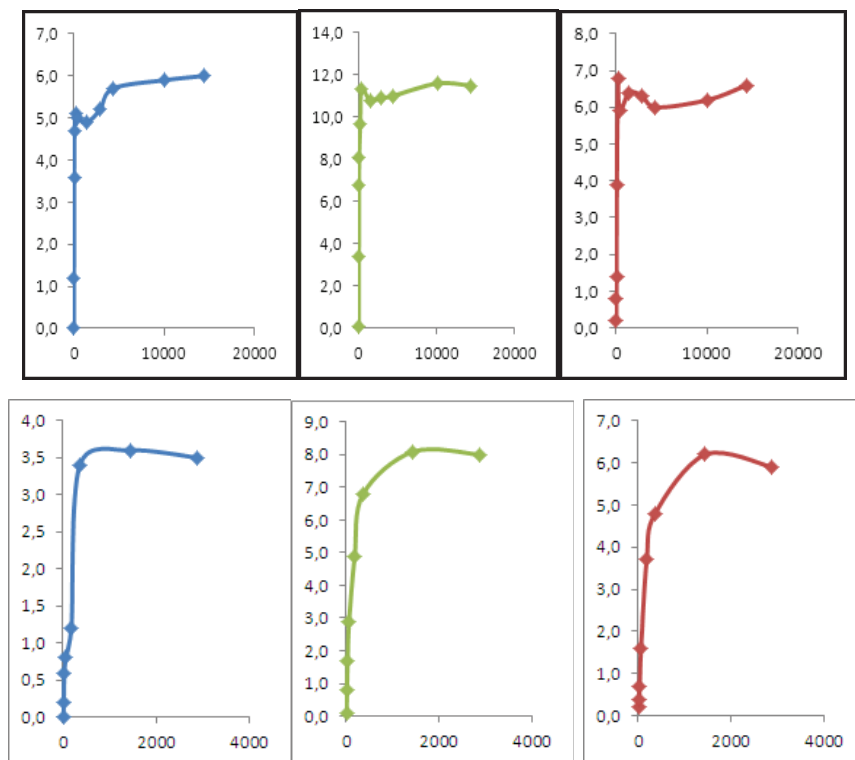


Tabella 4.4

Prova condotta a 40°C				
Data	Tempo (min)	Simulante B	Simulante C	Simulante X
		Conc (ug/L)	Conc (ug/L)	Conc (ug/L)
12/03/2013	5	0,0	0,1	0,2
12/03/2013	15	1,2	2,2	0,6
12/03/2013	30	3,9	3,7	0,9
12/03/2013	60	4,3	4,1	1,7
12/03/2013	180	4,2	7,9	5,4
12/03/2013	360	4,3	8,5	7,1
13/03/2013	1440	4,1	8,6	6,9
14/03/2013	2880	4,3	8,4	7,3
15/03/2013	4320	4,5	8,1	7,5
19/03/2013	10080	4,4	8,4	8,1
22/03/2013	14400	4,6	8,3	8,6

Grafici 4.3

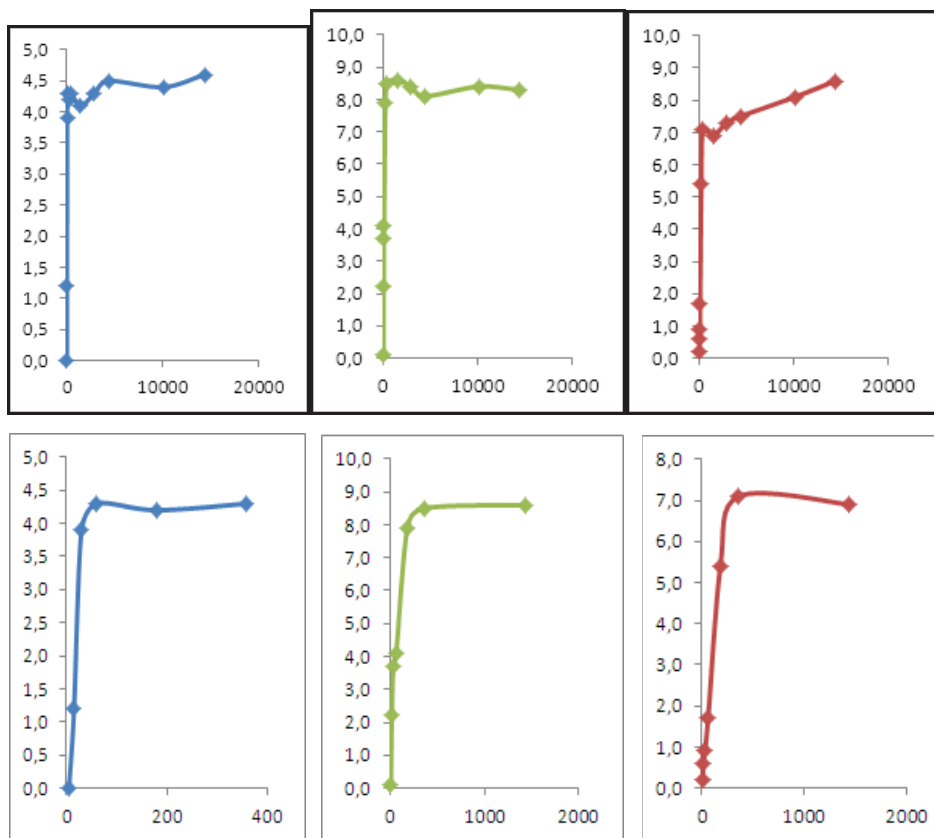
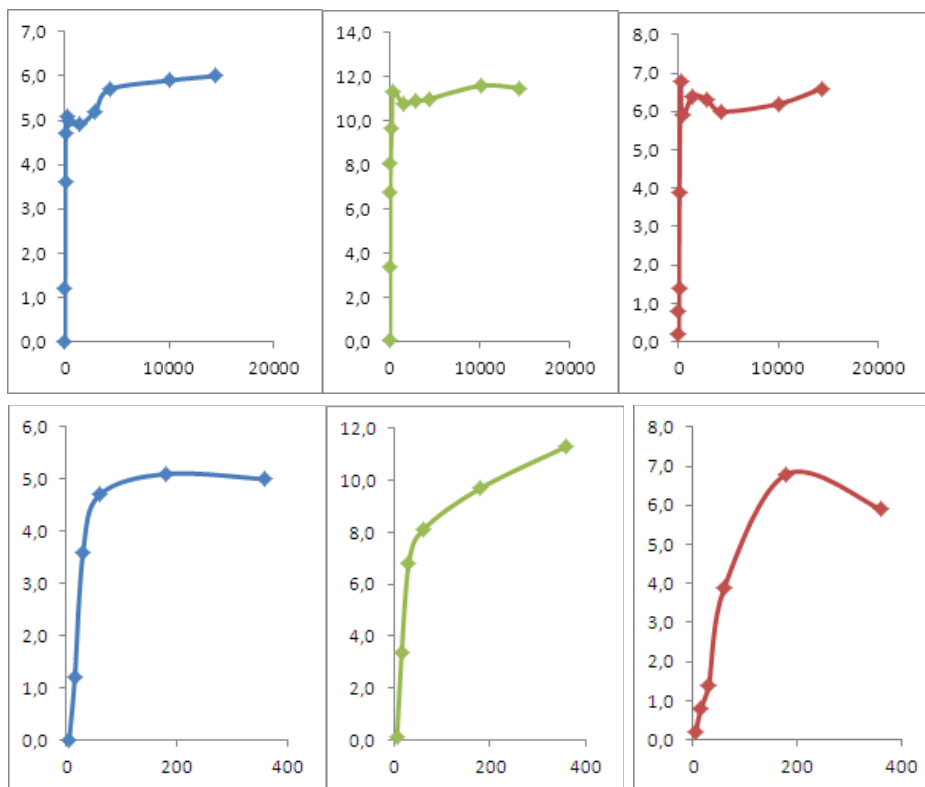


Tabella 4.5

Prova condotta a 70°C				
		Simulante B	Simulante C	Simulante X
Data	Tempo (min)	Conc (ug/L)	Conc (ug/L)	Conc (ug/L)
12/03/2013	5	0,0	0,1	0,2
12/03/2013	15	1,2	3,4	0,8
12/03/2013	30	3,6	6,8	1,4
12/03/2013	60	4,7	8,1	3,9
12/03/2013	180	5,1	9,7	6,8
12/03/2013	360	5,0	11,3	5,9
13/03/2013	1440	4,9	10,8	6,4
14/03/2013	2880	5,2	10,9	6,3
15/03/2013	4320	5,7	11,0	6,0
19/03/2013	10080	5,9	11,6	6,2
22/03/2013	14400	6,0	11,5	6,6

Grafici 4.4



Dall'andamento delle prove si desume che in nessun caso viene superato il limite di migrazione specifica (LMS) fissato nel 2004 dalla Commissione europea, pari, per il BPA, a 600 ng g^{-1} ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$) per la plastica a contatto con gli alimenti. Si può desumere altresì che, almeno relativamente alle condizioni sperimentali ed ai campioni esaminati, a grandi linee, dopo circa 360 minuti di contatto la quantità di BPA ceduta al simulante non varia apprezzabilmente; inoltre come prevedibile, i simulanti alcoolico (C) e quello alcalino (X) tendono a mobilitare una maggiore quantità di bisfenolo A.

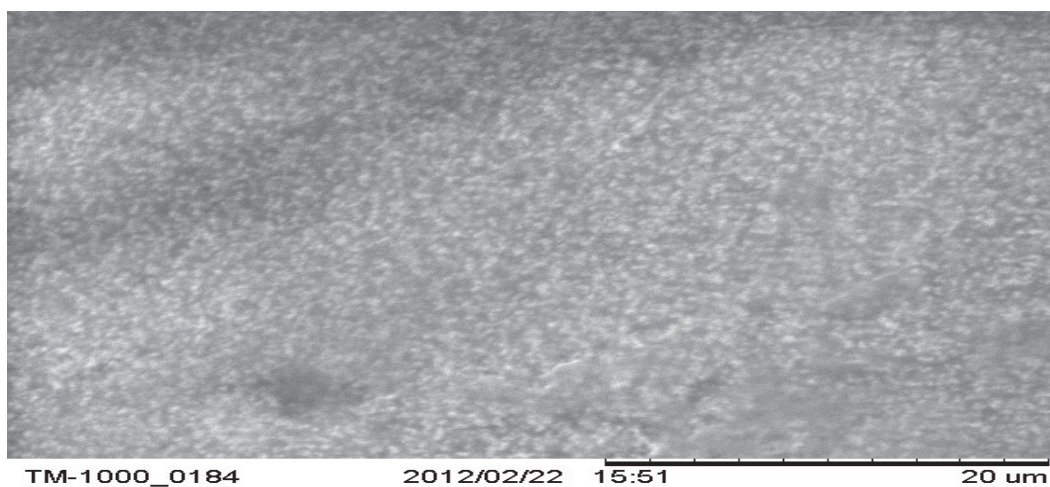
4.3 Il caso dello scatolame metallico con rivestimento interno BPA free

Nel corso di un indagine iniziale ricognitiva su varie tipologie di materiali, si è notato che alcuni contenitori metallici, pur essendo rivestiti internamente con verniciatura bianca, sono risultati negativi al BPA. Allo scopo di chiarire l'assenza di BPA analiticamente dimostrabile e dopo aver confermato i risultati, che sono riassuntivamente esposti nella tabella seguente:

Tabella 4.6

Prospetto riassuntivo contenuti di bisfenolo A (BPA) e BADGE in alcune tipologie di campioni merceologici						
			Bisfenolo A		BADGE	
Tipologia campione	Massa, g	Volume mL	Ppb	mg/kg	ppb	mg/kg
Rivestimento interno bianco lattina pomodorini banda stagnata	0,0160	1,40	141,0	12,34	Non rilevabile	Non rilevabile
Rivestimento interno bianco banda alluminio (mais in scatola)	0,0187	1,40	Non rilevabile	Non rilevabile	Non rilevabile	Non rilevabile
Composito dentario per otturazioni bianco a base epossifenolica	0,0181	1,40	318,7	24,65	Non rilevabile	Non rilevabile
Scontrino di carta termica	0,6337	4,00	2860,3	18,05	Non rilevabile	Non rilevabile

Figura 4.1 Foto al SEM del rivestimento bianco BPA-free packaging in banda alluminio



si è proceduto ad una caratterizzazione in uno dei rivestimenti interni dei packaging precedentemente esaminato per BPA, prima con FTIR – ATR, che ha dimostrato la natura inorganica del rivestimento e quindi mediante Microscopia elettronica a scansione abbinata alla Spettroscopia a raggi X a dispersione di energia (SEM-EDS). Di seguito (Fig.4.2) è riportato lo spettro infrarosso in riflessione totale attenuata (FTIR-ATR), ottenuto con uno spettrometro IR Perkin Elmer Spectrum One, con accessorio ATR diamante/ZnSe del rivestimento BPA positivo di riferimento (lining interno delle lattina di banda stagnata usate per lo studio); nella figura 4.3, invece lo spettro del BPA usato come standard.

Figura 4.2

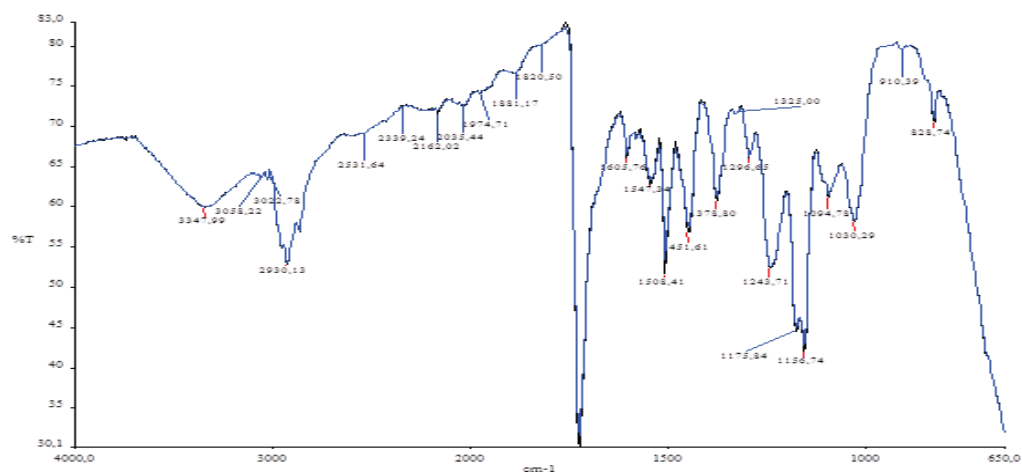
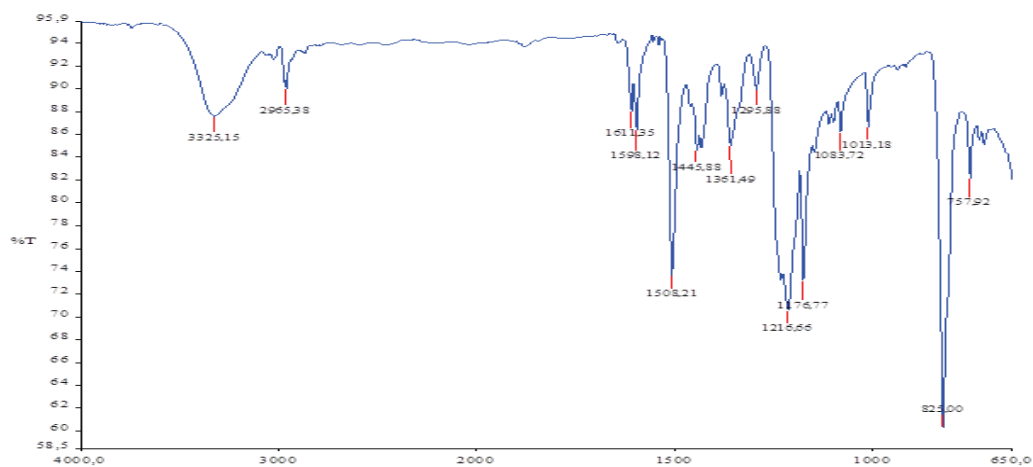


Figura 4.3



Gli spettri FT-IR dei rivestimenti interni si mostrano ben diversi. Nel caso del rivestimento interno del barattolo di alluminio si ottiene un profilo spettrale assolutamente privo di picchi od anche soltanto bande di una qualche utilità diagnostica e pertanto qui non viene riportato; per contro, lo spettro del rivestimento interno di una delle scatole di banda stagnata, mostrato sopra, assai caratteristico, conferma la natura organica del rivestimento.

Tabella 4.7 Condizioni operative e risultato dell'analisi SEM-EDS

Condizioni di acquisizione	
Acquisition time (s)	46.6
Accelerating voltage (kV)	15.0
Quantification method	All elements (normalised)
Alluminio	5.3% (in peso)
Titanio	94.7 (in peso)

Si desume che il rivestimento interno bianco in questo caso è costituito verosimilmente da biossido di titanio; la piccola percentuale di alluminio è dovuta al fondo del supporto. Pertanto lining interno bianco dello scatolame metallico non significa necessariamente che si tratti di verniciatura epossifenolica o comunque organica e che gli alimenti in esso contenuti siano contaminati da BPA..

Capitolo 5 Valutazione del livello di contaminazione da BPA in alcuni alimenti tipo.

Numerosi gruppi di ricerca in tutto il mondo stanno pubblicando continuamente lavori sul monitoraggio del BPA negli alimenti inscatolati. Un contributo a questa ricognizione analitica, a scopi di indagine preliminare, e verifica della validità della procedura analitica con campioni reali è stato fatto esaminando alcune tipologie di alimenti inscatolati e bevande imbottigliate. Il limite di rivelabilità, riferito al campione è 1,0µg/L o 1,0µg/kg. Dopo innumerevoli prove fatte per trovare un'ideale metodologia preparativa, è stata adottata una procedura di derivatizzazione. Questa infatti tranne pochi casi, si è dimostrata sempre

necessaria. Scartata la derivatizzazione con anidride acetica si è provata con esito soddisfacente la silanizzazione con N-O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) adattando e modificando le procedure proposte in letteratura (Arakawa et al., 2004; Kuo & Ding, 2004; Fernandez et al., 2007; Vinas et al., 2010); la massa del campione, a seconda della tipologia, oscillava dai 500 mL ai 5-20 g, determinando poi, sempre, il pH per le motivazioni esposte nel precedente capitolo.

5.1 Procedura e condizioni operative

Le concentrazioni di BPA negli alimenti sono stati determinati mediante GC / MS. Omogeneizzati campioni alimentari in esame (tipicamente, 5 g) sono stati essiccati a 60 ° C e trasferiti in fiala da 5 mL con 0,5 mL di H₂O e sono stati poi aggiunti. 1,0 mL di acetato di etile (Romil, Cambridge, Inghilterra) contenente lo standard interno BPA-d16 (ISOTEC, Aldrich, Taufkirchen, Germania). Il pallone viene posto in un bagno di acqua 60 ° C ad ultrasuoni e irradiato per 30 min. Poi 500 uL di supernatante sono stati trasferiti in fiale di vetro di reazione da 1 mL e gli estratti sono stati concentrati sotto flusso di azoto. Quindi sono stati aggiunti 50 uL di N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) (Supelco, Sigma, Germania). Le fiale sono state sigillate con liners cap di teflon / silicone e riscaldate in un forno (70 ° C) per 2 ore. Sono stati rimossi dal forno le fiale di vetro da 1 mL e sono stati aggiunti 50 uL di acetato di etile. Campioni di 1 uL sono stati iniettati nel sistema GC-MSD (gascromatografo GC2010Plus accoppiato ad un rivelatore di massa 2010Plus selettiva; Shimadzu Corp., Kyoto, Giappone).

Condizioni cromatografiche

Le separazioni GC sono stati raggiunti con una colonna capillare 60 m 0,25 millimetri ZB-5ms silice fusa con 0,25 spessore μ m della Phenomenex (Torrance, CA, USA) con elio come gas di trasporto. La temperatura iniziale di 200 ° C è stato tenuto per 3 min e poi elevata a 20 ° C / min a 300 ° C. La temperatura dell'iniettore era di 280 ° C e la temperatura della linea di trasferimento era di 310 ° C. Il flusso di gas è stato impostato per ottenere una velocità lineare costante di 40 cm / sec e il flusso di scissione è stato fissato a 1:10. Il rivelatore a selezione di massa è stato operato in impatto elettronico (70 eV) e multi-ion modalità di rilevamento utilizzando m / z 357 (M-15 ion) per trimethylsilyl-BPA e m / z 368 per BPA-d16 come standard interno. In GC / MS cromatografia, i tempi di ritenzione per lo standard interno erano 7,832 e 7,877 min per il BPA. Lo spettro di massa del picco _nalco a 7,877

min ha rivelato ioni a m/z 372 ($M + \text{ion}$) per trimetilsilil-BPA e m/z 357 ($M-15 \text{ ion}$) per il trimetilsilil BPA demetilato. Gli spettri di massa dal genitore BPA e lo standard interno sono stati ottenuti utilizzando lo stesso sistema in modalità di scansione con un intervallo di massa m/z 50 di m/z 500 con velocità di 5000 amu / sec. Lo spettrometro di massa lancia le acquisizioni dopo 4 minuti di solvent cut time con una tensione di 930 V rivelatore (100 V di più di quella ottimale, calcolato con la procedura di tuning). Il livello di BPA nei campioni è stato calcolato sulla base del rapporto del BPA con risposta dell'area di picco dello standard interno. La pendenza del grafico (picco-rapporto superficie vs quantità di BPA ha indicato una dipendenza lineare ($R^2 = 0,9998$).

Tabella 5.1 Risultanze analitiche relative ad alcuni campioni alimentari

Alimento/bevanda	pH	Tipo di packaging	Concentrazione BPA
Bevanda analcolica a base di cola (1)	2,9	Lattina alluminio	$\leq 1,0 \mu\text{g/L}$
Bevanda analcolica a base di cola (2)	2,6	Bottiglia PET	$\leq 1,0 \mu\text{g/L}$
Acqua minerale non gassata	5,8	Bottiglia PET	$\leq 1,0 \mu\text{g/L}$
Bevanda analcolica a base di succo di arancia	3,4	Bottiglia PET	$\leq 1,0 \mu\text{g/L}$
Pomodori pelati (1)	4,46	Banda stagnata (lining side strip)	$\leq 1,0 \mu\text{g/kg}$
Pomodori pelati (2)	4,53	Banda stagnata (lining completo)	45,1 $\mu\text{g/kg}$
Cubettato di pomodori	4,32	Banda stagnata (lining side strip)	$\leq 1,0 \mu\text{g/L}$
Fagioli lessati	6,11	Banda stagnata (lining completo)	84,3 $\mu\text{g/kg}$
Preparazione di carne suina in scatola (tipo jambonet)	6.48	Banda stagnata (lining side strip)	$\leq 1,0 \mu\text{g/kg}$

I risultati relativi alla concentrazione di BPA nelle matrici alimentari esaminate sono per la maggior parte al disotto del limite di rivelabilità del metodo analitico; in due casi si sono riscontrate quantità sensibili; esse sono tuttavia confrontabili, ad esempio, con valori riferiti per alcuni campioni nella pubblicazione di Schecter et al.

Prospettive di approfondimento

La tematica qui sviluppata presenta un carattere propedeutico ad ulteriori sviluppi, carattere che ha assunto, in itinere, per il fermento scientifico che attualmente c'è sull'argomento. La verità è che questo percorso di studio dottorale ha sollevato, inaspettatamente, più interrogativi invece di quanti abbiano avuto risposta. Infatti vengono a delinearsi moltissime intriganti possibilità di indagine, sia per gli aspetti della ricerca di base, ad esempio relativamente al chimismo del BPA, che in campo agroalimentare e biomedico la cui interdisciplinarietà emerge chiaramente in tutti gli studi scientifici esaminati.

La speranza è di poter proseguire questo interessante cammino di ricerca intrapreso.

Bibliografia

- Arakawa C et al. (2004). Daily urinary excretion of bisphenol A. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 9:22–26.
- Arase S, Ishii K, Igarashi K, Aisaki K, Yoshio Y, Matsushima A, Shimohigashi Y, Arima K, Kanno J, Sugimura Y. Endocrine Disrupter Bisphenol A Increases In Situ Estrogen Production in the Mouse Urogenital Sinus. *Biol Reprod*. 2010 Dec 1. [Epub ahead of print]
- Ash, M. and I. Ash, *Handbook of Plastic and Rubber Additives*, Gower, Hampshire, 1995
- Assessment Profile. Existing Chemicals Database SIAM 14: 26-28.
- Ballesteros A. et al., Analytical methods for the determination of bisphenol A in food, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 449–469
- Bisphenol A Information Sheet. Bisphenol A Global Industry Group. October 2002, Retrieved 7 December 2010.
- Braun JM, Kalkbrenner AE, Calafat AM, Bernert JT, Ye X, Silva MJ, Barr DB, Sathyanarayana S, Lanphear BP. Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2011 Jan;119(1):131-7.
- Burridge E., *Eur. Chem. News*, Volume: 17, (2003), p. 14
- Cao X.L., Corriveau J., Popovic S., Migration of bisphenol A from can coatings to liquid formula during storage at room temperature, December 2010, *Journal of Food Protection*, 72(12): 2571-1574
- Chemical Weekly (2009). Bisphenol-A: A Techno-Commercial Profile. September 1, 2009:
- ChemSpider - The free chemical database, The Royal Society of Chemistry
- Commission Directive 2004/19/EC, of 1 March 2004, relating to plastic materials [content/uploads/issues/2009/07/pdf/reproductive_roulette.pdf](#)
- Cousins, I.T., Staples, C.A., Klecka, G.M., Mackay, D., 2002. A multimedia assessment
- de Baat, W. C., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, Vol 45, pp 237, 1926

De-Kun Li, et al. Relationship Between Urine Bisphenol-A Level and Declining Male Sexual Function, *Journal of Andrology*, Vol. 31, No. 5, September/October 2010

Developmental Effects of Bisphenol A. U.S. Department of Health and Human Services.

Dianin (1891). *Zhurnal russkogo fiziko-khimicheskogo obshchestva* 23: pp. 492–.

Dodds E. C. and W. Lawson, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 125, 839 (27-IV-1938), pp. 222–232.

Dodds E. C. and Wilfrid Lawson, "Synthetic OEstrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus", *Nature*, 137 (1936), 996.

EFSA-Q-2012-00423, Mandato M-2012-0117 del 06/07/2012 *in progress*.

EINECS (European INventory of Existing Commercial chemical Substances)

European Union Risk Assessment Report, 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A).

European-Union (2008) Updated European Risk Assessment Report
4,4'-Isopropylidenediphenol (bisphenol-A). Environment Addendum of February 2008 (to be read in conjunction with published EU RAR of Bisphenol A, 2003)

Fernandez MF et al. (2007). Bisphenol A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology*, 24:259–264.

Fiege, Helmut (2002) Phenol Derivatives. DOI: 10.1002/14356007.a19_313 ([http:// dx. doi. org/ 10. 1002/ 14356007. a19_313](http://dx.doi.org/10.1002/14356007.a19_313))

Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*. 2010 Oct;126(4):760-8.

Gazzetta Ufficiale della Unione europea - Direttiva 2011/8/UE della Commissione del 28 gennaio 2011

Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, Ann Arbor, Michigan.

I.B. Rufus, H. Shah, and C.E. Hoyle, *J. Appl. Polym. Sci.*, 51, 1549 (1994)

ICIS (2011). Bisphenol A (BPA) Production and Manufacturing Information.

Imballaggio in cifre 2012 - Istituto Italiano Imballaggi Generale-2012.pdf

Ioffe Institute Databases

J. Gorse, A.T. Balchunas, D.F. Swaile, and M.J. Sepaniak, J. High Resolut. Chromatogr. Commun., 11, 554 (1988)

Ji, A.Z., M.F. Nunez, D. Machacek, J.E. Ferguson, M.F. Iossi, and P.C. Kao, J. Chromatogr. B, 669, 15 (1995)

Joint Research Centre-Institute for Health and Consumer Protection (JRC-IHCP) (2010).

JPI Healthcare. (n.d.). "Ultrasound Paper." from <http://www.jpihealthcare.com/ultrasound-paper>.

Kolossa-Gehring, Marike, et al., "Environmental surveys, specimen bank and health related environmental monitoring in Germany", International Journal of Hygiene and Environmental Health Volume 215, Issue 2, February 2012, Pages 120–126

Kosky, P.E. , Guggenheim E.A., The aqueous Phase in the interfacial Synthesis of Polycarbonates. 1:Ionic equilibria and Experimental Solubilities in the BPA-NaOH-H₂O System, Eng.Chem.Res., 30 (3);462-467

Krishnan, A.V.,P. Stathis, S.F. Permuth, L. Tokes, D. Feldman, Endocrinology 132(1993) 2279

Lambert C. and M. Larroque, J. Chromatogr. Sci., 35, 57 (1997)

Lang et al., Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults, JAMA. 2008 Sep 17;300(11):1303-10.

Larroque, M. L. Vian, A. Blaise, and S. Brun, J. Chromatogr. A, 445, 107 (1988)

Li De Kun, et al. Occupational exposure to bisphenol-A(BPA) and the risk of Self-Reported Male Sexual Dysfunction, Human Repr., 2009

Li, D. , Fu, S. and C.A. Lucy, Anal. Chem., 71, 687 (1999)

Li, D., Zhou Z, Qing D, He Y, Wu T, Miao M, Wang J, Weng X, Ferber

Liao, C. and K. Kannan (2011b). "Widespread Occurrence of Bisphenol A in Paper ..."

Loganathan SN, Kannan K. Occurrence of Bisphenol A in Indoor Dust from Two Locations in the Eastern United States and Implications for Human Exposures. Arch Environ Contam Toxicol. 2011 Jan 8. [Epub ahead of print]

Lyndsey Layton. «Studies on Chemical In Plastics Questioned Congress Examines Role Of Industry in Regulation» ([http:// www.washingtonpost. com/ wp-dyn/ content/ article/ 2008/ 04/ 26/ AR2008042602126. html](http://www.washingtonpost.com/wp-dyn/content/article/2008/04/26/AR2008042602126.html)), April 27, 2008, p. A1..

Marozzi,S. et al, Sostanze chimiche negli alimenti, il caso degli interferenti endocrini, Industrie alimentari, XLIX, giugno 2010

Mendum, T., E. Stoler, et al. (2011). "Concentration of bisphenol A in thermal paper." Green Chemistry Letters and Reviews 4(1): 81-86.

MetzlerM., V. Pedraza, and N. Olea, Environ. Health Perspect., 106, 167 (1998)
MSDS Sigma, voce: "Bisphenol A"

Munguia-Lopez Elvia M. and Herlinda Soto-Valdez,Effect of Heat Processing and Storage Time on Migration of Bisphenol A (BPA) and Bisphenol A-Diglycidyl Ether (BADGE) to Aqueous Food Simulant from Mexican Can Coatings,J.Agric. Food Chem. 2001, 49, 3666-3671

N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1997.

N. Olea et al., Environ. Health Perspect., 104, 298 (1996)

Nashua Corporation. (2008). "Label Products."

National Toxicology Program-Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction (NTPCERHR) (2008). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive of the environmental fate of bisphenol A. Hum. Ecol. Risk Assess. 8, 1107e1135.

Official Journal of the European Communities L71 8
Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2002). "SIDS Initial

Perez P., et al. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography.Environ Health Perspect. 2000 January; 108(1): 21–27.

PiergiovanniLuciano, Sara Limbo, Food packaging, Materiali, tecnologie e qualità degli alimenti, Springer Verlag, Milano, 2010

Pingqing Fu, Kimitaka Kawamura, "Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere, Volume 158, Issue 10, October 2010, Pages 3138–3143"

Piscopo A., MOCA: materiali ed oggetti a contatto con gli alimenti, Eurocarni 4/12

Piscopo A., Un mondo di plastica: materiali a contatto con gli alimenti, Eurocarni 11/11

Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, Kittraki E. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience*. 2010 May 19;167(3):741-9.

Polycarbonate/BPA Global Group. (2011). "Bisphenol A." from <http://bisphenol-a.org/>.

Products: Implications for Human Exposure." *Environ. Sci. Technol.* 45: 9372-9379.

Ratio International Corporation Crystal Structure Catalogue

Reece Rushing, Reproductive Roulette declining Reproductive Health, dangerous chemicals, and a New Way Forward By July 2009

REGOLAMENTO (CE) N. 1895/2005 DELLA COMMISSIONE del 18 novembre 2005 relativo alla restrizione dell'uso di alcuni derivati epossidici in materiali e oggetti destinati a entrare in contatto con prodotti alimentari.

Rykowska I. and W. Wasiak,^{*} Properties, threats, and methods of analysis of bisphenol a and its derivatives, *acta chromatographica*, no. 16, 2006

Schecter et al., Bisphenol A (BPA) in U.S. Food, *Environ.Sci.Technol.* 44, 9545, 2010

Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1829.htm>

Sharman, M., C. Honeybone, S. Jickels, and L. Castle, *Food Addit. Contam.*, 12, 779 (1995)
SI Chemical Data Book (4th ed.), Gordon Aylward and Tristan Findlay, Jacaranda Wiley

Silberberg M. S *Chemistry*, 5th edition, McGraw-Hill, 2009.

Spectral Database for Organic Compounds, SDBS

Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH 2009. Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both. *Environ Health Perspect* 117:784-789.

Stahlhut RW, Welshons WV, Swan SH 2009. Bisphenol A Data in NHANES Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both. *Environ Health Perspect* 117:784-789.

Staples C.A. et al., A Review of the Environmental Fate, Effects, and Exposures of Bisphenol A. *Chemosphere*. 36(10):2149-73 (1998)

Staples C.A., Woodburn K., Caspers N., Hall T., Klecka G.M., Hum. Ecol. Risk Asses., Volume: 8, (2002), p. 1083.)

Takayanagi, et al. "Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity" *Toxicology Letters*, Volume 167, issue 2 (December 1, 2006), p. 95-105

Takeda Y, Liu X, Sumiyoshi M, Matsushima A, Shimohigashi M, Shimohigashi Y. Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR $\{\gamma\}$ among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERR γ isoform. *J Biochem*. 2009 Jul;146(1):113-22.

The Merck Index, 7th edition, Merck & Co, Rahway, New Jersey, USA, 1960.

Time trend of urinary BPA in young adults living in Germany (Ket al., in preparation) in comparison to BPA production data (EUROSTAT, 2011). Note: production data 2003, 2004, and 2009 are confidential.

Troisi Jacopo, Di Fiore Raffaele, Palumbo Giancarlo, "Almost omnipresent: Determination of bisphenol A in plastic packaging", *Shimadzu News* 1/2012, pag.22-24

Tuna EB, Aktoren O, Oshida Y, Gencay K. Elution of residual monomers from dental composite materials. *Eur. J. Paediatr. Dent*. 2010 Sep;11(3):110-4.

Tuna EB, Aktoren O, Oshida Y, Gencay K. Elution of residual monomers from dental composite materials. *Eur J Paediatr Dent*. 2010 Sep;11(3):110-4.

U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (2010a). Bisphenol A Action Plan

U.S. Environmental Protection Agency, Bisphenol A Alternatives in Thermal Paper Chapter 2 Products and Materials: BPA in Thermal Paper, July 2012 – DRAFT

Valletrisco, M., Palumbo G., Criticità della recente normativa europea in tema di materiale plastico per uso alimentare, *Tecnologie Alimentari*, N.3, 2012

Vanderschueren D. [Is male fertility declining?] Verh K Acad Geneeskd Belg. 1999;61(3):433-40.

Velasco-Marinero E, Herrero-Payo JJ, Carretero-González J. Changes in pituitary and prolactin cells of Wistar rats after two dental fillings with bisphenolic resins. Arch Oral Biol. 2010 Dec 14. [Epub ahead of print]

Vinas P et al. (2010). Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and bisphenol migrated from food cans. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397(1):115–125. Volume 167, Issue 2, 1 December 2006, Pages 95–105

Vom Saal, F.S., C. Hughes, Environ. Health Perspect. 113 (2005) 926.

Wells, A. F. , '*Structural Inorganic Chemistry*, 5th ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1984.

WHO/HSE/FOS/11.1, Xu-Liang Cao, Background Paper on Chemistry and Analytical Methods for Determination of Bisphenol A in Food and Biological Samples FAO/WHO Expert Meeting on Bisphenol A (BPA) Ottawa, Canada, 2–5 November 2010

Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ. The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. Horm Behav. 2010 Oct 26. [Epub ahead of print]

Yamamoto T. and A. Yasubara, Chemosphere, 38, 2569 (1999)

Yoshida, T. , M. Horie, Y. Hoshino, and H. Nakazawa, Food Addit. Contam., 18, 69 (2001)

Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. Chemosphere. 2011 Jan;82(3):424-30.

Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. Chemosphere. 2011 Jan;82(3):424-30.

Zincke, Theodor (1905). *Über die Einwirkung von Brom und von Chlor auf Phenole: Substitutionsprodukte, Pseudobromide und Pseudochloride*. Justus Liebigs Annalen der Chemie 343: 75–99.

Sitografia

(<http://www.istitutoimballaggio.it/dati-di-mercato/>)

<http://www.bisphenol-a.org/pdf/DiscoveryandUseOctober2002.pdf>

<http://chemfinder.cambridgesoft.com/>

http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/endodis_en.htm

http://ecb.jrc.it/documents/ExistingChemicals/RISK_ASSESSMENT/ADDENDUM/bisphenola_add_325.pdf.

http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol_A

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:IT:PDF>

<http://nashua.com/prodandservices/labelproducts.aspx?selected=labeltrans>.

<http://webbook.nist.gov/chemistry/>

<http://www.americanprogress.org/wp>

<http://www.astm.org> American Society for Testing and Materials (ASTM)

<http://www.cas.org/products/sfacad/index.html>

http://www.csi-spa.com/csi-spa/download/fpm/FPM_atti_1105_Riva.pdf

<http://www.endocrinedisruption.com/prenatal.criticalwindows.chemicals.bisphenola.php>

http://www.strategyr.com/Bisphenol_A_Market_Report.asp

<http://www.statcan.gc.ca/pub/82-625-x/2010002/article/11327-eng.htm>